

TESIS DE DOCTORADO

**METABOLISMO ENERGÉTICO
EN EL TEJIDO MARRÓN DE
CONEJO Y RATA SOMETIDO A
DIFERENTES CONDICIONES
EXPERIMENTALES DE AYUNO Y
FRÍO.**

Zuriñe López Ibarra

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y
APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS.

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO
AÑO 2019



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**METABOLISMO ENERGÉTICO EN EL TEJIDO MARRÓN DE CONEJO Y
RATA SOMETIDO A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES DE
AYUNO Y FRÍO.**

D. Antonio González Cantalapiedra.....

D. Antonio López Farré.....

D. Vicente Lahera Julia.....

(Si hay más de un director/a, duplique este párrafo)

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. Zuriñe López Ibarra, bajo mi
dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el
Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en
las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En July, 12 de July de 2018

Fdo.: Antonio González
Cantalapiedra

Fdo.: Antonio López Farré

Fdo.: Vicente Lahera Julia



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS
METABOLISMO ENERGÉTICO EN EL TEJIDO MARRÓN DE CONEJO Y
RATA SOMETIDO A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES DE
AYUNO Y FRÍO.

D./Dña. Zuriñe López Ibarra.....

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Lugo 10 de Diciembre de 2018



Fdo.: Zuriñe López Ibarra.



AGRADECIMIENTOS

Probablemente una de las partes más complicadas de escribir de una tesis sean los agradecimientos, ya que son muchas las personas que tiene que intervenir para que el trabajo de tesis llegue a su fin. En este sentido, a las primeras personas que quiero agradecer toda su dedicación, consejos y cariño, que estuvieron siempre siguiendo los experimentos y la escritura de esta tesis es a mis directores. Los profesores Antonio González Cantalapiedra, Vicente Lahera y Antonio López Farré. Evidentemente sin ellos este trabajo de tesis no hubiera podido realizarse.

También me gustaría agradecer toda su ayuda a mis compañeros del laboratorio y muy especialmente a José Zamorano-León y Begoña Larrea. Ellos han hecho muy fácil mi estancia en el laboratorio, además de su infinita paciencia para enseñarme las técnicas necesarias para realizar los experimentos.

Agradecer su ayuda a mis compañeros de trabajo, en especial a mi querida Amelie, que siempre tiene una palabra de ánimo para todos los proyectos que pasan por mi cabeza.

Finalmente quiero agradecer todo su esfuerzo, ayuda y comprensión a mi familia. A mis padres Antonio y Zuriñe, a mi hermano Ignacio por su cariño, apoyo constante. Tampoco quiero olvidarme de mis abuelos que siempre me apoyan en todo momento.

A Eduardo, que siempre conté con su apoyo incondicional y que sin él este trabajo hubiera sido imposible de realizar, por su paciencia y cariño, gracias.

En general agradecer a todas aquellas personas que me han aportado un poco de su tiempo en este trabajo y que han hecho posible que llegue a su fin todo este trabajo, en este momento de transición y cambio de país.

GRACIAS



INDICE





Indice

RESUMEN / SUMMARY	11
1. RESUMEN.....	13
2. SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	17
3. TERMOGÉNESIS EN	19
ANIMALES PEQUEÑOS	19
4. METABOLISMO ENERGÉTICO: GENERALIDADES Y CONCEPTOS BÁSICOS.	22
5. EL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS Y ÁCIDOS GRASOS.....	23
6. EL TEJIDO ADIPOSO: GENERALIDADES.....	27
7. TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.....	27
8. TEJIDO ADIPOSO Y ALMACENAJE DE TRIGLICÉRIDOS	31
9. REGULACIÓN HORMONAL DE LA LIPOGÉNESIS Y LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	33
10. TEJIDO ADIPOSO MARRÓN: REGULACIÓN DE UCP-1 POR REDUCCIÓN DE TEMPERATURA.....	35
11. ASOCIACIÓN ENTRE LA NOREPINEFRINA Y LA ESTIMULACIÓN DE UCP-1 EN TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.....	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
12. HIPÓTESIS.....	43
13. OBJETIVOS	44
MATERIALES Y METODOS.....	45
14. MODELOS EXPERIMENTALES	47
14.1 MODELO EN CONEJO NEW ZEALAND	47
14.2 MODELO EN RATA WISTAR	48
15. DETERMINACIÓN EN CONEJOS DE PARÁMETROS METABÓLICOS CIRCULANTES.....	49

16. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS ANALIZADAS MEDIANTE WESTERN BLOT.....	50
17. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LACTATO Y DE LAS ACTIVIDADES ACONITASA, LACTATO DESHIDROGENASA Y MALATO DESHIDROGENASA.....	53
18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
RESULTADOS.....	55
19. METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA GRASA MARRÓN Y GRASA BLANCA DE CONEJO.....	57
20. NIVELES DE UCP-1 EN GRASA MARRÓN Y GRASA BLANCA.....	58
21. EXPRESIÓN DE ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN GRASA MARRÓN Y GRASA BLANCA.....	59
22. METABOLISMO ANAERÓBICO EN LA GRASA MARRÓN Y EN LA GRASA BLANCA	63
23. EFECTO COMPARATIVO DE LA NOREPINEFRINA Y LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA GRASA MARRÓN.	65
23.1 EFECTO DE LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA (32°C) EN TEJIDO GRASO MARRÓN.....	65
23.2 COMPARACIÓN ENTRE TEJIDO ADIPOSO MARRÓN INCUBADO A 37°C Y EL INCUBADO A 32°C CON NOREPINEFRINA.	67
23.3 COMPARACIÓN ENTRE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS A 32°C EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE NOREPINEFRINA.	69
DISCUSIÓN	71
24. DIFERENCIAS EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA B- OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	73
25. DIFERENCIAS EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ANAERÓBICO.....	75
26. LA GLUCOSA EN EL TAM Y EN EL TAB.....	76
27. ¿SON SIMILARES LOS EFECTOS DE LA NOREPINEFRINA Y LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN?	80
27.1 EFECTOS DE LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA EN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN TAM.....	80

27.2 EFECTOS DE LA COMBINACIÓN NOREPINEFRINA+REDUCCIÓN DE TEMPERATURA	82
28. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y COMENTARIOS.....	86
CONCLUSIONES.....	89
29. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y COMENTARIOS.....	91
BIBLIOGRAFÍA	93
30. BIBLIOGRAFÍA.....	95
ANEXO I.....	107
ANEXO II	111





RESUMEN / SUMMARY





1. RESUMEN

La termogénesis no temblorosa es importante para mantener de la temperatura corporal en neonatos de muchas especies de mamíferos, además de en los mamíferos hibernantes.

El tejido adiposo blanco (TAB) es un órgano compuesto fundamentalmente de adipocitos llenos de lípidos. El tejido adiposo marrón (TAM) está formado por adipocitos marrones y, a diferencia del tejido adiposo blanco, tiene un gran número de mitocondrias. En el tejido adiposo marrón la generación de calor se produce por la activación de la proteína desacoplante 1 (UCP-1) que desacopla la cadena respiratoria mitocondrial. La norepinefrina ha sido considerada único estimulador de la activación de UCP-1. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado la ineficacia de los agonistas de los receptores β -adrenérgicos para producir pérdida de peso y termogénesis.

Objetivos: Esta tesis analiza si el metabolismo energético durante el periodo de ayuno a temperatura fisiológica es igual en el tejido adiposo blanco que en el tejido adiposo marrón en lagomorfos.

En la segunda parte de la tesis se analizó si realmente la norepinefrina es el único responsable de los cambios en el metabolismo enzimático en el tejido adiposo marrón en condiciones de reducción de temperatura.

Métodos: El estudio comparativo del metabolismo de TAB y TAM se realizó en conejos New Zealand machos mantenidos previamente a la obtención de los tejidos durante 24 horas en ayuno, con libre acceso al agua y a $23\pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura ambiente.

Para analizar el efecto de la temperatura y norepinefrina sobre el metabolismo del TAM, este se obtuvo de ratas Wistar macho incubándose una vez aislado durante 24 horas a 37°C o 32°C . Se realizaron experimentos adicionales incubando TAM a 32°C con norepinefrina (10^{-6} mol/L).

La expresión de las proteínas se determinó por Western blot y las actividades enzimáticas o el contenido de lactato se determinaron mediante kits comerciales.

Resultados: En los tejidos grasos de los conejos se observó que el nivel de expresión de carnitina palmitoiltransferasa (CPT) -I y CPT-II, transportadores mitocondriales de ácidos grasos, y la enzima relacionada con la oxidación de ácidos grasos β , acil CoA deshidrogenasa, fue mayor en TAM que en TAB. La expresión de lactato deshidrogenasa y el contenido de lactato fue también mayor en TAM que en TAB.

En el análisis del efecto de la norepinefrina y reducción de temperatura en TAM aislado se observó que en el TAM incubado a 32°C aumentó los niveles de expresión proteica de CPT-I, CPT-II y de UCP-1 además de la expresión y actividad de lactato deshidrogenasa. La expresión mitocondrial de la cadena α de la F1-ATP sintasa disminuyó a 32°C en comparación con 37°C.

La presencia de norepinefrina en TAM incubado a 32°C mantuvo una expresión de UCP-1 y cadena- α F1-ATP sintasa semejantes a las observadas en TAM incubando solamente a 32°C sin norepinefrina.

Conclusiones: Las conclusiones principales fueron que en conejos New Zealand sometidos a 24 horas de ayuno y temperatura fisiológica, el TAM tiene una maquinaria enzimática mayor para el transporte mitocondrial de ácidos grasos y su β -oxidación, además de parecer utilizar el metabolismo anaeróbico en mayor medida que el TAB. También en los experimentos in vitro con TAM se observó que la reducción de temperatura, independientemente de norepinefrina, estimula la expresión de UCP-1 y reduce la de la subunidad alfa de la ATP-sintasa. Esto sugiere que la reducción de la temperatura per se induce modificaciones en la expresión de proteínas asociadas a reducción en la generación de ATP, sugiriéndose la generación de calor sin norepinefrina.

2. SUMMARY

Non-trembling thermogenesis is important for maintaining body temperature in neonates of many mammalian species, as well as in hibernating mammals.

The white adipose tissue (TAB) is an organ composed mainly of adipocytes full of lipids. Brown adipose tissue (TAM) is formed by brown adipocytes and, unlike white adipose tissue, has a large number of mitochondria. In brown adipose tissue, the generation of heat is produced by the activation of decoupling protein 1 (UCP-1) that uncouples the mitochondrial respiratory chain. Norepinephrine has been considered the sole stimulator of UCP-1 activation. However, different studies have shown the ineffectiveness of β -adrenergic receptor agonists to produce weight loss and thermogenesis.

Objectives: This thesis analyzes whether the energy metabolism during the fasting period at physiological temperature is the same in white adipose tissue as in brown adipose tissue in lagomorphs.

In the second part of the thesis it was analyzed whether norepinephrine is the only one responsible for the changes in the enzymatic metabolism in brown adipose tissue under conditions of temperature reduction.

Methods: The comparative study of the metabolism of TAB and TAM was carried out in male New Zealand rabbits maintained before obtaining the tissues during 24 hours in fasting, with free access to water and at $23\pm 2^\circ\text{C}$ of room temperature.

To analyze the effect of temperature and norepinephrine on TAM metabolism, this was obtained from male Wistar rats being incubated once isolated for 24 hours at 37°C or 32°C . Additional experiments were performed incubating TAM at 32°C with norepinephrine (10^{-6} mol/L).

The expression of the proteins was determined by Western blot and the enzymatic activities or the lactate content were determined by commercial kits.

Results: In the fatty tissues of rabbits we observed that the expression level of carnitine palmitoyltransferase (CPT)-I and CPT-II, mitochondrial fatty acid transporters, and the enzyme related to the oxidation of fatty acids β , acyl CoA dehydrogenase, was higher in TAM than in TAB. Lactate dehydrogenase expression and lactate content was also higher in TAM than in TAB.

In the analysis of the effect of norepinephrine and temperature reduction in isolated TAM, it was observed that in the TAM incubated at 32° C, the protein expression levels of CPT-I, CPT-II and UCP-1 were increased in addition to the expression and activity of lactate dehydrogenase. The mitochondrial expression of the α chain of F1-ATP synthase decreased at 32° C compared to 37° C.

The presence of norepinephrine in TAM incubated at 32° C maintained an expression of UCP-1 and α -F1-ATP synthase chain similar to those observed in TAM incubating only at 32° C without norepinephrine.

Conclusions: The main conclusions were that in New Zealand rabbits subjected to 24 hours of fasting and physiological temperature, the TAM has a greater enzymatic machinery for the mitochondrial transport of fatty acids and its β -oxidation, in addition to apparently using the anaerobic metabolism in greater as the TAB. Also in the in vitro experiments with TAM it was observed that the reduction of temperature, independently of norepinephrine, stimulates the expression of UCP-1 and reduces that of the alpha subunit of ATP-synthase. This suggests that the reduction of the temperature per se induces modifications in the expression of proteins associated with reduction in the generation of ATP, suggesting the generation of heat without norepinephrine.

INTRODUCCIÓN





3. TERMOGÉNESIS EN ANIMALES PEQUEÑOS

La temperatura corporal se controla mediante el mantenimiento del equilibrio entre la producción y la pérdida de calor.

La pérdida de calor, y en particular la velocidad de esta pérdida, en los organismos va a ser dependiente de dos factores fundamentales que son la velocidad de conducción del calor hasta la piel y la velocidad de conducción del calor desde la piel al entorno exterior. Esta pérdida de calor al entorno se produce por radiación, conducción y evaporación. La pérdida de calor por radiación se hace en forma de rayos infrarrojos ya que todos los objetos radian ondas infrarrojas. Dependiendo si la temperatura corporal es mayor o menor al entorno se radiaran rayos infrarrojos hacia fuera o hacia dentro del cuerpo.

La pérdida de calor por conducción se hace por contacto directo con un objeto mientras que la pérdida de calor por convección se debe al movimiento del aire. El aire más cercano a la superficie de la piel se calienta por conducción y cuando este aire se retira, la piel conduce calor a la nueva capa de aire que no se ha calentado.

La evaporación es también un mecanismo de pérdida de calor cuando la temperatura es alta. Cuando se evapora agua, por cada gramo de esta que pasa a estado gaseoso se pierden 0,58 calorías de calor. En este sentido, los animales capaces de perder calor por evaporación pueden llegar a ser este mecanismo el responsable de hasta el 22% de la pérdida de calor del cuerpo.

Cuando el organismo está demasiado frío, se estimulan los sistemas de producción y conservación del calor. Entre ellos los principales serían: la vasoconstricción de los vasos sanguíneos de la piel, lo que disminuye la transferencia de calor desde el cuerpo, la piloerección que eleva el vello para atrapar aire próximo a la piel creando una capa de aire aislante. Este mecanismo es más frecuentemente utilizado en animales que tienen pelo.

Podríamos definir, por lo tanto, la termorregulación como el mantenimiento de una temperatura corporal relativamente constante para asegurar unas óptimas funciones fisiológicas y para la supervivencia, a pesar de los cambios ambientales que puedan ocurrir en la temperatura.

La temperatura esta captada por receptores específicos, unos de tipo periférico superficial y otros en ubicación nuclear, que envían información a un centro termorregulador que es el hipotálamo. En este sentido, el

hipotálamo desempeña un papel clave en la regulación de la temperatura. Así, en el área preóptica se desarrolla el centro termolítico (disminución de la temperatura), y en el hipotálamo dorsolateral hay un centro termogénico (aumento de la temperatura).

Es obvio que los animales, al igual que el ser humano, tienen que regular su temperatura corporal, y para ello pueden utilizar diferentes mecanismos en función de las características de cada animal. Sirva como ejemplo que muchos animales regulan su temperatura corporal mediante el comportamiento, como buscar el sol o la sombra, o amontonarse para compartir calor.

El calor corporal de un animal puede provenir de dos fuentes fundamentales que además sirve a su vez para poder clasificarlos (1):

1.- Animales endotermos: La endotermia es el mecanismo de obtención de calor corporal por producción interna. Los animales endotermos presentan mecanismos metabólicos que generan calor (termogénesis). Estos mecanismos requieren gastos energéticos y alimenticios elevados.

2.- Animales ectotermos: La ectotermia ocurre en animales que obtienen el calor corporal del ambiente, tomando el sol (heliotermia) o colocándose cerca de fuentes de calor como rocas calentadas por el sol (tigmotermia), etc. Al no gastar energía en generar calor, sus requerimientos energéticos son más bajos y no necesitan alimentarse tan a menudo como lo necesitan los endotermos. En este sentido, los animales endotérmicos tienen que mantener temperaturas corporales elevadas dentro de un rango estrecho mediante la producción de calor a través de procesos metabólicos. Así, el índice metabólico de los animales endotérmicos es varias veces mayor que el de los ectotérmicos y su producción de calor dependerá de las fluctuaciones de la temperatura ambiental (2).

Aves y mamíferos serían animales endotermos (generan calor metabólico) y homeotermos (su temperatura es constante) mientras que reptiles, anfibios y el resto de animales serían ectotermos (obtienen calor de fuentes externas) y poiquilotermos, su temperatura varía con la del ambiente. No obstante, existen excepciones a esta clasificación y entre ellas podemos considerar la heterotermia que ocurre en animales que pueden pasar de la endotermia a la ectotermia. Ésta se suele dar en aves y mamíferos pequeños, con tasas metabólicas altas (muy activos y con requerimientos

energéticos altos) que reducen su temperatura durante períodos de inactividad. Estos períodos de inactividad pueden ser anuales o diarios.

Los períodos de inactividad anuales son conocidos como hibernación (o estivación si se dan en verano). La hibernación la suelen llevar a cabo mamíferos típicamente endotermos como las ardillas, pequeños primates, erizos y muchos marsupiales. Los osos aunque también hibernan y disminuyen su metabolismo, no sufren un descenso tan brusco de temperatura corporal (ésta solo disminuye uno o dos grados).

Ya hemos anteriormente comentado de forma breve que la termogénesis es el fenómeno fisiológico por el que los animales pueden generar calor y esta puede a su vez clasificarse en:

1.1. Termogénesis temblorosa, en la que la generación extra de calor se debe a contracciones repetidas involuntarias del músculo esquelético. Este temblor produce descenso del flujo sanguíneo periférico y se la considera también como la “termogénesis rápida”.

1.2. Termogénesis no temblorosa, también llamada termogénesis facultativa, cuyo responsable sería el tejido adiposo marrón. Es una termogénesis química, de origen hormonal por la que se produce calor mediante el metabolismo energético activo en el tejido marrón reduciendo la eficiencia energética del metabolismo de los nutrientes.

La termogénesis temblorosa es la respuesta más temprana y primitiva para aumentar la producción de calor (3). Esta forma de termogénesis consume grandes cantidades de energía y no es efectiva durante frío severo (por ejemplo 4-6°C para roedores) o durante exposiciones prolongadas al frío, interfiriendo con la actividad normal del animal. Por lo tanto, es comprensible que las especies homeotérmicas disponen de un mecanismo de termogénesis no temblorosa que utiliza mecanismos metabólicos para generar calor (4). En este sentido, la termogénesis no temblorosa es especialmente importante en el mantenimiento de la temperatura corporal en los neonatos de muchas especies de mamíferos, incluida la especie humana, además de en los mamíferos hibernantes. También, la termogénesis no temblorosa tiene un papel fundamental en la regulación de la temperatura corporal de los adultos de muchas especies con relación a la temperatura ambiental, pudiéndose modificar en función de los cambios puntuales de la temperatura exterior ambiental, y por la exposición crónica al frío.

Es importante finalmente señalar el hecho de que los animales más pequeños, especialmente aquellos con una mayor relación superficie-volumen, por lo tanto más propensos a perder calor, tienen mayores tasas metabólicas que las especies más grandes, durante su evolución estas especies aprendieron además a estimular su metabolismo energético para producir el calor suficiente para mantener sus demandas diarias.

4. METABOLISMO ENERGÉTICO: GENERALIDADES Y CONCEPTOS BÁSICOS.

El metabolismo es el conjunto de intercambios y transferencias de materia y energía. El metabolismo puede consistir en la degradación de moléculas (recibe entonces el nombre de catabolismo), o bien puede producir la síntesis de nuevas sustancias desde otras más simples (recibe entonces la denominación de anabolismo).

El metabolismo catabólico, el metabolismo energético, está diseñado para que, mediante la degradación de diferentes moléculas, obtener energía en forma de ATP. Por lo tanto, el metabolismo energético es la parte del metabolismo celular destinado a almacenar y consumir combustibles para generar ATP para cubrir las necesidades energéticas del organismo.

El ATP es un nucleótido compuesto por una base nitrogenada (adenina), una pentosa (ribosa) y un grupo fosfato (tres radicales fosfato con enlaces de alta energía) (Figura 1).

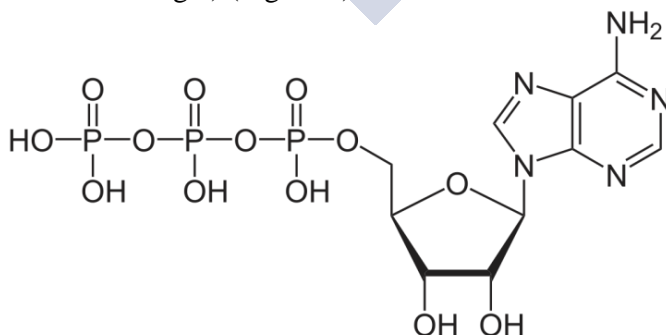


Figura 1. *Molécula de ATP en la que se observa los tres grupos fosfatos, la ribosa y la base nitrogenada, adenina.*

El ATP es importante en el mantenimiento de la funcionalidad celular ya que es lo que va a permitir a las células, y por lo tanto al organismo, a llevar a cabo todas sus funciones y actividades biológicas. Entre estas funciones se encuentran:

- La síntesis de nuevas moléculas celulares a partir de precursores más simples.
- El transporte e intercambio de iones de acuerdo con gradientes de concentración.
- La producción de movimiento.
- Producción de calor para mantener la temperatura corporal
- Etc..

Para obtener el ATP, la célula utiliza los nutrientes esenciales, fundamentalmente carbohidratos, grasas en forma de triglicéridos, y proteínas. Esta obtención de ATP puede producirse además en presencia de oxígeno (metabolismo aeróbico) utilizando la cadena respiratoria mitocondrial (fosforilación oxidativa) o en su ausencia (metabolismo anaeróbico), utilizando la conversión de piruvato en lactato mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.

5. EL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS Y ÁCIDOS GRASOS.

Aunque posteriormente analizaremos con una mayor profundidad el metabolismo de los ácidos grasos y carbohidratos en el tejido adiposo, pasaremos brevemente a analizar el metabolismo general de ambos. Como muestra la figura 2, el final común del metabolismo de ácidos grasos y de la glucosa es la producción de acetil CoA, para que en condiciones de aerobiosis posteriormente se genere a través del ciclo de Krebs, y fundamentalmente de la fosforilación oxidativa ATP (Figura 2).

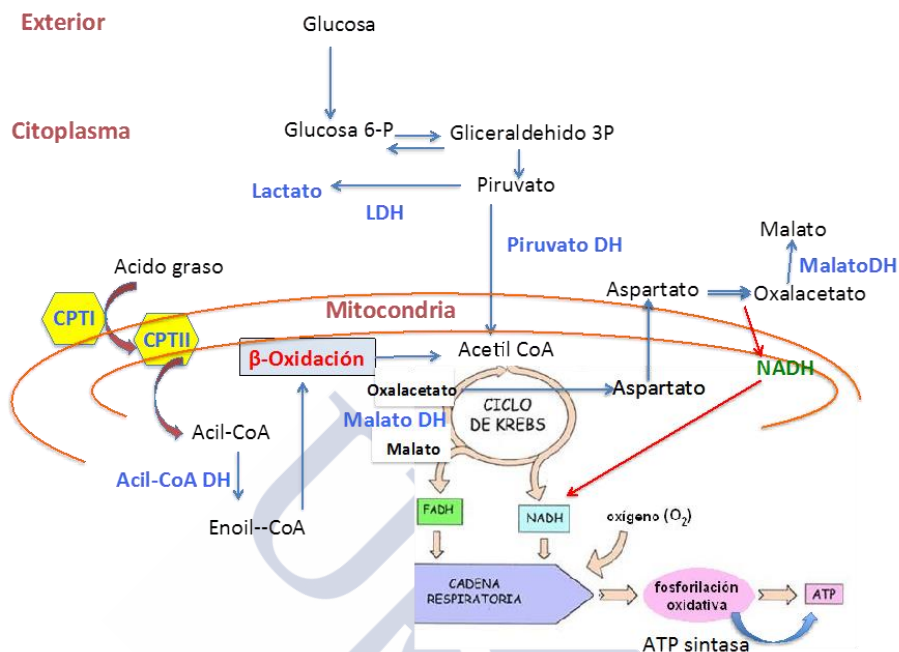


Figura 2.- Principales vías catabólicas de los ácidos grasos y la glucosa. **Abreviaturas:** CPT: carnitina palmitoil transferasa; DH: deshidrogenasa.

Gracias a su fácil metabolismo, los carbohidratos son las principales moléculas destinadas al aporte de energía. El principal carbohidrato para la obtención de energía es la glucosa. El transporte de la glucosa a través de la membrana celular se lleva a cabo por dos familias de proteínas de membrana: los transportadores de glucosa acoplados a sodio y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT). Las primeras se expresan principalmente en epitelios que se encargan de la absorción y de la reabsorción de nutrientes, esto es, el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal respectivamente. Los GLUT se expresan en todas las células del organismo y permiten mover la glucosa de un compartimiento a otro.

Además de la dieta, la glucosa sanguínea proviene también de la gluconeogénesis hepática y/o de su movilización a partir del glucógeno almacenado. El rango de los niveles de la glucosa en la sangre es muy estrecho gracias a la acción de varias hormonas, como la insulina, el glucagón, la adrenalina y el cortisol y la insulina. De todas ellas, la insulina

podemos considerarla la principal hormona reguladora de los niveles circulantes de glucosa teniendo una potente acción hipoglucemiante. El efecto hipoglucemiante de la insulina se debe principalmente a que induce la exposición de los transportadores GLUT a la membrana plasmática de las células de músculo esquelético, los adipocitos y los hepatocitos, produciendo la entrada masiva de glucosa en estos tejidos y bajando su nivel en la sangre.

Se han identificado 14 transportadores GLUT (GLUT1 hasta GLUT14) divididas en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales, como su especificidad al sustrato (glucosa, fructosa y/ o galactosa), sus valores de K_m , o su respuesta a los bloqueadores específicos, citocalasina B y forskolina.

El metabolismo de la glucosa ocurre a través de la glucólisis. La glucólisis se inicia en el citosol y produce dos ácidos pirúvicos a partir de cada molécula de glucosa (Figura 2). En la matriz mitocondrial, el ácido pirúvico se transforma en acetil CoA mediante el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa. El acetil CoA continuará su proceso catabólico, en la mitocondria, a través del Ciclo del Ácido Cítrico o ciclo de Krebs, llamado así en honor de su descubridor Hans-Krebs. En el ciclo además de 2 ATP por molécula de glucosa, se genera también NADH y el $FADH_2$ que serán utilizados en la fosforilación oxidativa en la mitocondria, ya que ambos contienen electrones de alta energía, para generar protones que, posteriormente, mediante la actividad del complejo de la ATP sintasa mitocondrial generarán más moléculas de ATP y H_2O . En concreto, por cada dos electrones que pasan del NADH al oxígeno se forman 3 moléculas de ATP. Por cada dos electrones que pasan desde el $FADH_2$ al oxígeno forman 2 moléculas de ATP.

Como hemos comentado anteriormente, existe otra forma de obtención de energía a partir de la glucosa. Esta es la vía anaeróbica en la que está involucrada la enzima lactato deshidrogenasa (Figura 2). En esta vía el piruvato no se transforma en acetil CoA sino que mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasas se transforma en lactato (Figura 2). El lactato puede ser transferido por la sangre al hígado donde es convertido a piruvato por la lactato deshidrogenasa, ya que es una enzima reversible en su acción, y después a glucosa por la vía de la gluconeogénesis. Este ciclo de conversión de lactato en glucosa se conoce como el ciclo de Cori.

Otra de las fuentes principales de generación de energía son los ácidos grasos. Los ácidos grasos que forman parte de los triglicéridos son inicialmente liberados de ellos y transportados al interior de la mitocondria.

Para el transporte de los ácidos grasos desde el citoplasma de la célula al interior mitocondrial se necesita la acción de transportadores específicos en la membrana mitocondrial denominados carnitina palmitoil transferasa (CPT) I y II (Figura 2). Estos transportes CPT-I y CPT-II se han asociado también al desarrollo de patologías tales como la resistencia a la insulina. En este sentido, la resistencia a la insulina puede deberse a un desbalance en el transporte de lípidos al interior de las células y la capacidad de la mitocondria de oxidar ácidos grasos de cadena larga. Este efecto se ha estudiado particularmente en el músculo esquelético observándose que un exceso en el depósito de ácidos grasos en la célula permite la acumulación de triglicéridos, diacilgliceroles y ceramidas. En este sentido, la acumulación de estas fracciones lipídicas va a producir modificaciones en las señales de la insulina y con ello resistencia a la insulina (5,6).

En el interior de la mitocondria y mediante el proceso denominado β -oxidación, los ácidos grasos serán transformados en acetil CoA. La β -oxidación es una secuencia de cuatro reacciones en que se separan fragmentos de dos carbonos desde el extremo carboxilo ($-\text{COOH}$) de la molécula; estas cuatro reacciones se repiten hasta la degradación completa de la cadena. El nombre de β -oxidación deriva del hecho de que se rompe el enlace entre los carbonos alfa y beta (segundo y tercero de la cadena, contando desde el extremo carboxílico), se oxida el carbono beta (el C3) y se forma acetil-CoA. Posteriormente, el acetil CoA generado seguirá el mismo proceso de degradación a través del ciclo de Krebs, que el anteriormente explicado para los hidratos de carbono.

Aunque posteriormente se describirá con un mayor detalle, la célula tiene mecanismos alternativos para generar NADH para proveer de esta molécula a la fosforilación oxidativa con el fin de generar más protones. Uno de estos mecanismos es la lanzadera del malato-aspartato (7).

La lanzadera del malato-aspartato es un sistema que permite la oxidación del NADH citosólico para que este pueda ser usado en la matriz mitocondrial de la célula. En la lanzadera, el aspartato sale de la mitocondria por el transportador glutamato-aspartato, transformándose el aspartato en oxalacetato por la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa. El oxalacetato es entonces transformado en malato por la acción de la malato deshidrogenasa citosólica (7). Es una forma sobre todo de transportar NADH desde el citosol a la matriz mitocondrial. Así, el malato generado pasa al interior mitocondrial mediante el transportador malato-alfa-cetoglutarato generándose NADH que puede pasar directamente a la fosforilación oxidativa. No hay que confundir al malato

deshidrogenasas citosólica con la mitocondrial. Esa última, la mitocondrial, genera oxalacetato a partir de malato.

6. EL TEJIDO ADIPOSO: GENERALIDADES

El tejido adiposo es un órgano diseñado para almacenar el exceso de carbonos en forma de ácidos grasos esterificados con glicerol (triglicéridos). Sin embargo, hoy se reconoce que el tejido adiposo cumple otras muchas funciones. Estas funciones diferentes del tejido adiposo también están relacionadas con la existencia de diferentes tipos de tejido adiposo. En este sentido, en mamíferos el tejido adiposo está compuesto al menos por dos tipos: el tejido adiposo blanco (WAT de sus siglas en inglés White Adipose Tissue) y el tejido adiposo marrón (BAT de sus siglas en inglés Brown Adipose Tissue). Al igual que al tejido adiposo blanco se le ha relacionado con el acúmulo de energía en forma de triglicéridos, el tejido adiposo BAT se reconoce como principal contribuyente en el mecanismo de la defensa de la temperatura del cuerpo, fenómeno conocido como termogénesis (8). La implicación del tejido adiposo marrón en la termogénesis parece estar estrechamente relacionada con una de las características del BAT que es la expresión de la enzima desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial, la proteína desacoplante mitocondrial-1 (UCP-1, de sus siglas en inglés (UnCoupling Protein-1) (9,10).

7. TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

El tejido adiposo blanco es un órgano compuesto fundamentalmente de adipocitos llenos de lípidos. El adipocito representa, por lo tanto, la unidad básica del tejido adiposo, constituyendo entre uno y dos tercios del mismo (11). En el tejido adiposo blanco, el adipocito tiene una forma variable, aunque generalmente es esférica con un tamaño entre 25-200 μm . Tiene

también un núcleo periférico y plano y un citoplasma o citosol delgado que contiene una única gota lipídica grande que ocupa el 90% del volumen total del adipocito (Figura 3).

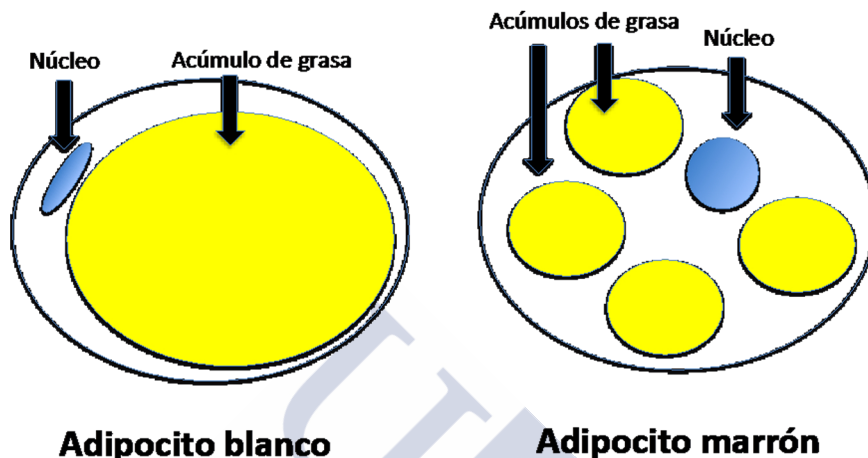


Figura 3.- Adipocito blanco y marrón

El tejido adiposo blanco contiene pocas mitocondrias y un pequeño retículo endoplasmático liso y rugoso. El resto del tejido adiposo blanco está formado por células sanguíneas, endoteliales y precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, fundamentalmente fibroblastos, aunque también aparecen preadipocitos, además de células mesenquimales, probablemente diferenciadas, y células grasas muy pequeña (12) (Figura 4). Este tejido está infiltrado por varias células inmunológicas como macrófagos, linfocitos (13) (Figura 4).

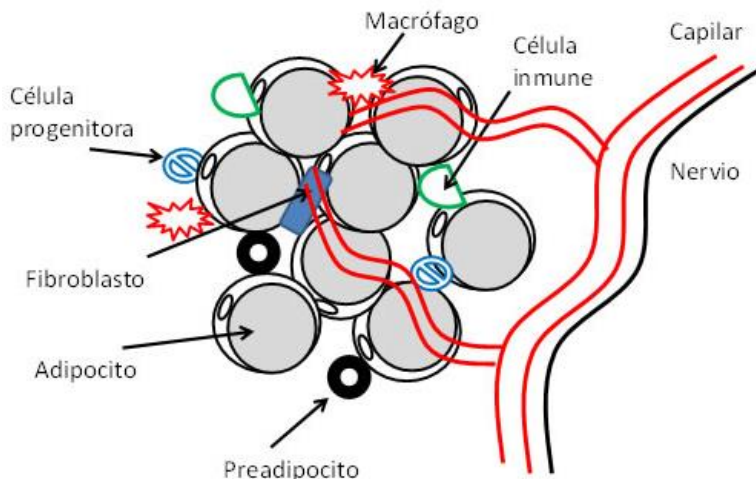


Figura 4.- Composición celular del tejido adiposo

El tejido adiposo se localiza principalmente bajo la piel, pero también se encuentra rodeando los órganos internos. También se forma y acumula tejido adiposo graso en la zona del abdomen. La grasa abdominal tiene un perfil metabólico diferente, siendo más propensa a inducir una resistencia a la insulina. Esto se relaciona con que la obesidad central es un marcador para el defecto de tolerancia a la glucosa y es un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular.

El adipocito tiene su origen a partir de células precursoras o preadipocitos, las cuales, bajo el estímulo de diferentes hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes, inician un proceso de diferenciación morfológica y funcional hasta convertirse en un adipocito maduro, lo que se conoce como adipogénesis (14), proceso que ocurre durante toda la vida de los mamíferos. En este sentido, es importante recordar que el tejido adiposo blanco no sólo es un órgano de reservorio de energía sino también un órgano secretor de ciertas moléculas que tienen una acción endocrina, paracrina y autocrina (15,16). Algunas de estas moléculas secretadas por los adipocitos están implicadas en la regulación del peso corporal (leptina, adiponectina) (17), en la respuesta inflamatoria generada localmente en una situación de obesidad (citoquinas como: TNF-alfa, IL-6 e IL-1 β) (18), en la función vascular (angiotensina II) (19) o incluso reproductora (20) (Figura 5).

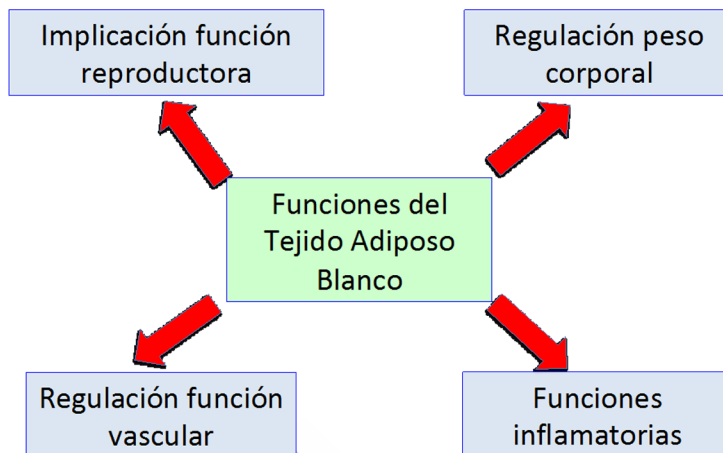


Figura 5.- Algunas funciones del tejido adiposo blanco.

El tejido adiposo marrón está formado por adipocitos marrones y células progenitoras de adipocitos. El adipocito marrón tiene una forma poligonal con un núcleo oval y centrado en un citoplasma grande que contiene múltiples y pequeñas gotas lipídicas (21) (Figura 3). A diferencia del tejido adiposo blanco, el marrón tiene un gran número de mitocondrias (22) y un retículo endoplasmático poco desarrollado. El tejido adiposo marrón está además muy vascularizado e innervado (23). La activación del tejido adiposo marrón ocurre con el frío y con la activación simpática del sistema nervioso, como luego explicaremos con mayor detalle.

Una de las principales localizaciones del tejido adiposo marrón se encuentra en el tejido interescapular. También se ha identificado tejido adiposo marrón en la región paraaórtica y suprarrenal, además de localizarse pequeños grupos de adipocitos marrones en el interior del músculo esquelético (24,25).

Recientemente se han encontrado adipocitos marrones en el interior de depósitos de tejido adiposo blanco y se los ha denominado células adiposas beige (23). Dichas células son positivas para UCP-1, con alta capacidad respiratoria, con características del tejido adiposo blanco y marrón y con una alta sensibilidad a la hormona irisina. En este sentido, la irisina secretada por el músculo esquelético, aumenta por el ejercicio induciendo la «marronización» del tejido adiposo blanco subcutáneo (26,27). Sin embargo, esta proteína tiene poco efecto en los clásicos adipocitos marrones aislados del depósito interescapular. Estos datos sugieren que la

respuesta a la irisina podría ser una característica selectiva de las células beige localizadas en el interior de los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo (26,27).

8. TEJIDO ADIPOSO Y ALMACENAJE DE TRIGLICÉRIDOS

El adipocito es la célula de almacenamiento de triglicéridos, la forma de acumularse los lípidos. Los triglicéridos están sometidos a un constante flujo de síntesis y degradación dependiente del momento en el ciclo ayuno/saciedad. Es decir, este flujo de síntesis y degradación en los periodos de ingesta de alimentos y ayuno, se regula a través de las hormonas pancreáticas, insulina y glucagón. Cuando la insulina se infunde a concentraciones fisiológicas elevadas, ocurre una inhibición completa de la liberación de ácidos grasos no esterificados desde el tejido adiposo. Este fenómeno se produce mediante una doble acción: a) inhibición de la lipasa sensible a hormona que degrada triglicéridos mediante la defosforilación de esta enzima y b) reesterificación de ácidos grasos. Por el contrario, la movilización de los ácidos grasos necesita la activación de la lipasa sensible a hormona por fosforilación. La fosforilación de esta enzima ocurre por la proteína quinasa A. También para este proceso se necesita la fosforilación de la perilipina, una proteína que se localiza alrededor de la gota lipídica y que debe moverse de allí para que permita la accesibilidad de la lipasa sensible a hormona para que se puedan catabolizar los triglicéridos (Figura 6).

La activación aguda de la lipólisis puede ocurrir también por la acción de catecolaminas (Figura 6), que actúan a través de receptores beta-adrenérgicos, aunque en situaciones de ayuno durante la noche, cuando la lipólisis aumenta de manera constante, la estimulación beta adrenérgica no parece que este implicada. Otros mediadores generados en el propio tejido adiposo, como por ejemplo factores inflamatorios o incluso del estrés oxidativo, y procesos fisiológicos como el ejercicio, van a participar también en el proceso de acumulación y degradación de los triglicéridos en el tejido adiposo.

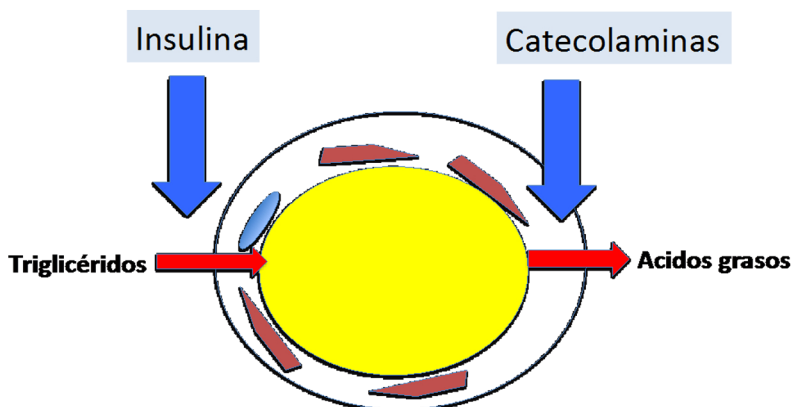


Figura 6.- La acción de la insulina en el adipocito blanco es fundamentalmente acumular triglicéridos en la gota lipídica del tejido adiposo blanco. Las catecolaminas sin embargo, metabolizan los triglicéridos en sus ácidos grasos correspondientes.

En los periodos entre comidas, la necesidad de energía de otros órganos induce la movilización de los almacenes de triglicéridos desde el tejido adiposo. Este proceso se llama **lipólisis** en cuyo proceso una molécula de triglicéridos es hidrolizada hasta generar tres moléculas de ácidos grasos y una de glicerol. Los ácidos grasos libres abandonarán los adipocitos para circular en el plasma uniéndose a la albumina y desde allí llegar al músculo para que mediante su oxidación este tejido pueda obtener energía. También los ácidos grasos libres pueden llegar al hígado donde se esterificarán en triglicéridos y podrán entrar a formar parte de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

El proceso metabólico opuesto a la lipólisis es **la lipogénesis**. Mediante la lipogénesis se generan ácidos grasos a partir de generalmente carbohidratos como la glucosa. La lipogénesis ocurre fundamentalmente en el tejido adiposo y en el tejido hepático y puede estimularse esta vía metabólica mediante el consumo de dietas altas en carbohidratos.

Las dos enzimas principales de la lipogénesis de nuevo son la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa que utilizan acetil-CoA y malonil-CoA formados desde la glucosa, o desde otros precursores que contengan moléculas de carbono, para generar palmitato. El palmitato se puede modificar por enzimas de tipo enlongasas endógenas y enzimas desaturasas para producir los diferentes especies de lípidos.

Como hemos indicado anteriormente, para la formación de los triglicéridos se requiere glicerol y ácidos grasos. En el adipocito no hay glicerol quinasa por lo que el precursor, en estas células, para la formación

de triglicéridos es la dihidroacetona fosfato que se produce en la glicolisis, lo que significa que el adipocito necesita glucosa. En el adipocito la glucosa se capta fundamentalmente a través del receptor GLUT4.

La síntesis de glicerol ocurre mediante la enzima glicerol 3-P deshidrogenasa que necesita gastar una molécula de NADH. En el tejido adiposo, tras obtenerse el L-glicerol-P, las enzimas acil transferasas transfieren dos grupos acilos de ácidos grasos activados (Acil-CoA), a los hidroxilos del glicerol, dando lugar al ácido fosfatídico. Este proceso requiere un gasto energético de 4 ATP. El ácido fosfatídico puede dirigirse a la síntesis de triacilglicéridos, gastando ~2ATP más en la activación del Acil-CoA restante.

9. REGULACIÓN HORMONAL DE LA LIPOGÉNESIS Y LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

En el tejido adiposo, al igual que ocurre en el muscular, la insulina estimula la traslocación de los transportadores GLUT4 desde compartimientos intracelulares a la membrana plasmática de los adipocitos (células del tejido adiposo), con la finalidad de que se capte mayor cantidad de glucosa y así disminuya su concentración en la sangre (28). Sin embargo, como ya anteriormente se indicó, en el tejido adiposo la insulina no promueve el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, sino que estimula la síntesis de triglicéridos y la lipogénesis. Por eso, se ha considerado inicialmente que la estimulación de la glicolisis en el tejido adiposo blanco no va dirigida a la obtención de energía, sino que fundamentalmente tiene como objetivo obtener dihidroacetona fosfato. A partir de la dihidroacetona fosfato se producirá el proceso de la formación de nuevos triglicéridos, ya que se generaría glicerol-3 fosfato por la actividad glicerol-3 fosfato deshidrogenasa (Figura 7).

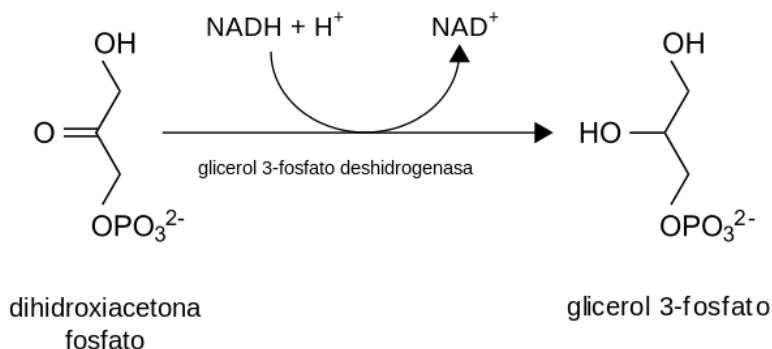


Figura 7.- Formación de glicerol 3-fosfato desde dihidroxiacetona fosfato.

El glicerol 3-fosfato también se obtiene por la vía gluconeogénica mediante sustratos de la gluconeogénesis, como lo es el piruvato. Para la obtención de piruvato también se estimula, por parte de la insulina, la captación y metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo blanco.

Un efecto opuesto a la insulina sobre el metabolismo del tejido adiposo tienen las catecolaminas. Durante el ejercicio físico o en los periodos de ayuno, las catecolaminas estimularán la lipólisis en el tejido adiposo blanco (29). Las catecolaminas se unen a sus receptores β -adrenérgicos y estimulan la actividad de la adenilato ciclasa, lo que hace que aumente la concentración intracelular de AMP cíclico y se produce entonces la activación de la proteína quinasa a (PKA). En los periodos de alimentación, la insulina activa diferentes fosfodiesterasas que degradan el AMP cíclico, inhibiendo así la lipólisis. Se ha sugerido que la actividad lipolítica en respuesta a las catecolaminas es diferente según la localización de la grasa blanca. Así, la actividad más alta de las catecolaminas se encuentra sobre la grasa visceral, en segundo lugar en la grasa subcutánea abdominal, y en tercer lugar, con actividad más baja, la grasa subcutánea de tejidos periféricos.

El glucagón es otra hormona que tiene una importancia fundamental en la estimulación de la lipólisis. El glucagón hace, como las catecolaminas que aumente el AMP cíclico y se active la PKA (30). La PKA fosforila a unas lipasas sensibles a hormonas, activándolas (31). Como hemos indicado anteriormente, las lipasas catalizan la degradación de los triglicéridos contenidos en los adipocitos generándose los ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos saldrán desde el adipocito a la sangre llegando a través de ella a los tejidos, principalmente al músculo para, mediante la

beta oxidación de los ácidos grasos, obtener energía. Por otra parte, el glicerol también saldrá del adipocito, difundiendo libremente por el plasma hasta que llegue al hígado. En el hígado el glicerol es utilizado también como sustrato en el proceso de la gluconeogénesis para formar glucosa.

10. TEJIDO ADIPOSO MARRÓN: REGULACIÓN DE UCP-1 POR REDUCCIÓN DE TEMPERATURA.

Una de la principales funciones del tejido adiposo marrón es la activación de la termogénesis a través de la activación de la proteína desacoplante 1 (UCP-1) generando calor (8,10,32). UCP1 se encuentra localizada exclusivamente en la membrana interna de la mitocondria del adipocito marrón, y cuando se activa desacopla la cadena respiratoria de la mitocondria y de esta manera se genera calor (Figura 8).

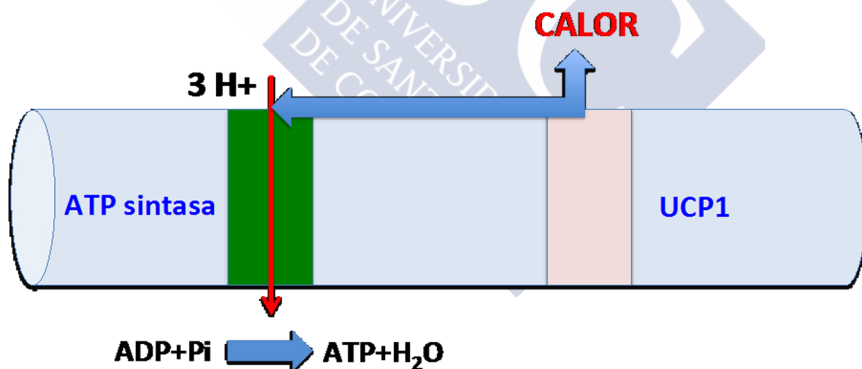


Figura 8.- La ATP sintasa genera una molécula de ATP y otra de agua cada tres protones. UCP1 capta protones generando calor e impidiendo que la ATP sintasa genere ATP.

En mitocondrias aisladas de grasa parda, los nucleótidos de purina se unen a UCP1 e inhiben su actividad de captación de protones (33,34). Sin embargo, en las mitocondrias aisladas de grasa marrón los ácidos grasos pueden modificar de forma competitiva la inhibición de UCP-1 producida

por nucleótidos aumentando así la conductancia y captación de los protones (35).

Hay más datos en la literatura que parecen apuntar hacia la importancia que pueden tener los ácidos grasos libres en la activación de UCP1. Por ejemplo, en roedores la producción de termogénesis parece estar asociada con el mantenimiento de un pool suficiente de ácidos grasos libres, y con la activación de la entrada de estos ácidos grasos a través de sus transportadores mitocondriales CPT-I y II. Así, inhibidores del CPT-I inhiben la estimulación del consumo de oxígeno y de la captación de glucosa por adipocitos marrones estimulados con catecolaminas (36). Esta misma disminución se ha observado en tejido adiposo marrón depleccionado de ácidos grasos libres o en situaciones donde la lipólisis está disminuida. Además, la disrupción genética de la acil-CoA deshidrogenasa, enzima involucrada en la β -oxidación de los ácidos grasos, produce intolerancia al frío (37,38). Además de los ácidos grasos libres, se han identificado otros activadores de UCP-1 incluyendo al anión superóxido lo que podría sugerir también la relación de la actividad UCP-1 con los radicales libres (39).

11. ASOCIACIÓN ENTRE LA NOREPINEFRINA Y LA ESTIMULACIÓN DE UCP-1 EN TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

El tejido adiposo marrón es un tejido muy innervado. En este sentido, y según los datos hasta el momento publicados, la activación de UCP-1 por el frío se ha asociado de forma totalmente dependiente de la liberación de norepinefrina. Por lo tanto, la norepinefrina sería la catecolamina que estimularía la termogénesis en el tejido adiposo marrón. La presencia de norepinefrina estimula el metabolismo del adipocito marrón unas 10 veces produciendo calor. Se ha calculado que el calor producido por norepinefrina sobre un adipocito marrón es de alrededor de 3 nanowatts, que corresponden aproximadamente a 300 watts por kilogramo de tejido.

En el tejido adiposo marrón, la norepinefrina se une a los receptores

β 3-adrenérgicos induciendo la activación de UCP-1. En este sentido, la activación de los receptores β 3-adrenérgicos por la norepinefrina en el tejido adiposo marrón se ha asociado con estimulación de lipólisis y la generación de calor (40,41). Además, la infusión de norepinefrina en conejos New Zealand se asoció con un aumento del consumo de oxígeno en el tejido adiposo marrón. Este efecto fue acompañado por un aumento de los niveles circulantes de ácidos grasos libres y glicerol, junto con una producción de calor rápida y sostenida (41). Esta y otras observaciones similares han apoyado que la respuesta metabólica a la reducción de la temperatura en el tejido adiposo marrón estaba completamente mediada por la norepinefrina.

Como hemos indicado, el efecto termogénico de la norepinefrina ocurre a través de su unión a receptores adrenérgicos de tipo β 3. Estos receptores están acoplados a proteínas Gs. La infusión de norepinefrina estimula a través de estas proteínas la actividad adenilato ciclasa y, con ello, la formación de AMP cíclico y la activación de la PKA. En este sentido, la termogénesis puede ser simulada en el tejido adiposo marrón mediante activadores de la adenilato ciclasa como la forskolina, lo que aumentará la producción de AMP cíclico. Por otro lado, la inhibición de la actividad PKA mediante el empleo de un inhibidor específico como es el H-89, inhibe los efectos de la norepinefrina sobre la termogénesis del adipocito marrón. Todas estas observaciones apoyarían la teoría de que a través de la estimulación de la PKA la norepinefrina estimularía la activación de UCP-1 en el tejido adiposo marrón, produciendo calor. En este sentido, y tomando en conjunto lo expuesto hasta este momento, la norepinefrina estimularía la liberación de ácidos grasos desde los triglicéridos mediante la activación de las lipasas (42). Los ácidos grasos serán transportados al interior de las mitocondrias y servirán de sustrato para la respiración mitocondrial y por lo tanto para la generación del gradiente de protones. Los ácidos grasos libres también se unirán a la UCP-1 estimulándola y promoviendo su actividad lo que induce la conductancia de protones. La disipación de los protones por UCP-1 puede aumentar el índice de respiración mitocondrial para producir más calor (Figura 9).

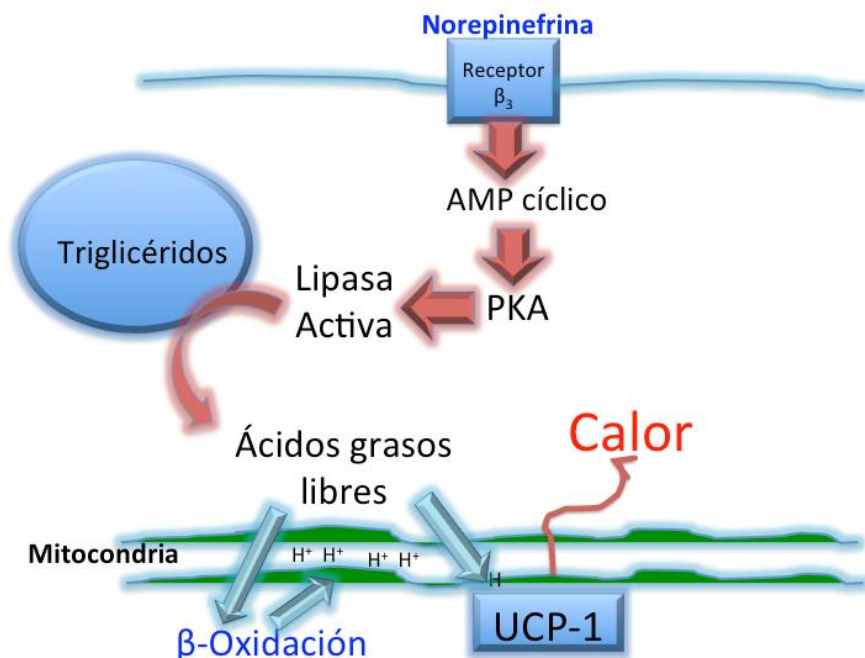


Figura 9.- Integración de la activación del tejido graso pardo por norepinefrina, la oxidación de los ácidos grasos y la activación de UCP-1 en la producción de calor.

Además de estimular la oxidación de los ácidos grasos, en el proceso de la termogénesis mediada por norepinefrina en el tejido adiposo marrón se ha demostrado también la participación de la captación de glucosa in vitro en ausencia de insulina (43,44). En este sentido, estudios en humanos utilizando tomografía de emisión de positrones para analizar la captación de glucosa mediante el empleo de un análogo de la glucosa, la fluorodeoxiglucosa, han demostrado que bajo condiciones de temperatura reducida, el pretratamiento con antagonistas β -adrenérgicos, redujo la captación de fluorodeoxiglucosa por el tejido graso marrón (45,46).

Estas observaciones volvieron a apoyar la teoría de que el efecto de la reducción de temperatura sobre el metabolismo del tejido graso marrón fueron totalmente mediados por norepinefrina. Sin embargo, otros datos pueden no apoyar esta hipótesis. En este sentido, estudios experimentales han demostrado que un aumento del metabolismo del tejido adiposo marrón redujo el peso corporal, lo que además se atribuyó a un aumento en la actividad de la norepinefrina. No obstante, otros estudios han demostrado

la ineficacia de los agonistas de los receptores β -adrenérgicos para inducir pérdida de peso y termogénesis (47, 48, 49). Además, en ratones que no pueden expresar UCP-1 (ratones knockout para UCP-1), el efecto estimulador de la norepinefrina sobre la utilización de la glucosa para generar calor en el tejido adiposo marrón desaparece totalmente (50). Esta observación sugiere que el aumento en la utilización de la glucosa por el tejido adiposo marrón después de su estimulación por frío es dependiente de UCP-1 mejor que la estimulación solamente por norepinefrina (50).

Si tomamos en conjunto todos estos datos publicados hasta el momento de forma conjunta podemos decir que existen dudas sobre si los efectos metabólicos en el tejido adiposo marrón inducidos por la reducción de temperatura son realmente dependientes de la estimulación adrenérgica. Este será otro de los fundamentos principales de la realización de este trabajo de tesis.

Otra cuestión importante que se debe señalar, y que será otro de los motivos de estudio en este trabajo de tesis, es que la mayoría de los estudios publicados se han focalizado en analizar el metabolismo energético en el tejido adiposo marrón en situaciones de frío o incluso durante el proceso de termogénesis inducida por la dieta y que es mucho menos conocido el metabolismo del tejido marrón en situaciones de ayuno y su posible diferencia con el tejido adiposo blanco durante estas condiciones de ayuno y temperatura corporal fisiológica.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





12. HIPÓTESIS

La función fisiológica más importante del tejido marrón es la conocida como termogénesis sin temblor que es el mecanismo primario por el que los mamíferos, sobre todo pequeños, pero también para el ser humano, puedan prevenir la hipotermia.

Los adipocitos del tejido adiposo marrón son muy ricos en mitocondrias que expresan singularmente la proteína desacoplante UCP-1. Cuando esta proteína se activa se disipan los protones, reduciéndose la generación de ATP por la actividad ATP sintasa de la cadena respiratoria mitocondrial. Entonces se genera calor.

El tejido adiposo blanco es el componente celular principal en los depósitos de grasa viscerales y subcutáneos. Además de ser un reservorio de grasa, el tejido adiposo blanco es también un órgano endocrino. Durante el ayuno, el metabolismo energético que se produce en el tejido adiposo blanco se ha analizado de forma extensa y está bien reconocido la estimulación del proceso denominado lipólisis.

En cuanto al tejido adiposo marrón, existen datos en la literatura analizando su metabolismo energético en situaciones de reducción de frío o incluso durante el proceso de termogénesis inducida por la dieta. Sin embargo, solamente está parcialmente estudiado como es el metabolismo energético en el tejido adiposo marrón en condiciones de termoneutralidad. Por todo ello, la primera hipótesis de este trabajo de tesis es que podría ser posible que el metabolismo energético durante el periodo de ayuno y a temperatura fisiológica no sea igual en el tejido de grasa blanca que en el tejido de grasa marrón en animales pequeños y en concreto en lagomorfos.

La segunda hipótesis que se analizará en esta tesis es sobre la relación entre la noradrenalina y la reducción de temperatura en el metabolismo energético del tejido adiposo marrón. En este sentido, según los datos hasta el momento publicados, la activación de UCP-1 por el frío se ha asociado de forma totalmente dependiente de la liberación de norepinefrina. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado la ineficacia de los agonistas de los receptores β -adrenérgicos para producir pérdida de peso y termogénesis. Además, en ratones knockout para UCP-1, el efecto estimulador de la norepinefrina sobre la utilización de la glucosa para generar calor en el tejido adiposo marrón desaparece de forma total. Por ello, esta segunda hipótesis va encaminada a sugerir que algunos de los cambios metabólicos que ocurren en el tejido adiposo marrón por reducción

de temperatura son independientes de norepinefrina.

13. OBJETIVOS

1.- Analizar en condiciones de ayuno y termonormalidad rutas metabólicas del metabolismo aeróbico y anaeróbico en el tejido adiposo blanco de conejos. Específicamente, analizar el metabolismo de la glucosa, la beta-oxidación de ácidos grasos y la lanzadera aspartato-malato relacionada con la gluconeogénesis.

2.- Estudiar en condiciones de ayuno y termonormalidad las mismas rutas metabólicas del objetivo 1 pero en el tejido adiposo marrón de conejos.

3.- Comparar en condiciones de ayuno y termonormalidad las rutas metabólicas de los dos objetivos anteriores entre los tejidos adiposos marrón y blanco en conejos.

4.- Determinar en un modelo in vitro, si la presencia y ausencia de norepinefrina durante la reducción de temperatura en el tejido adiposo marrón modifica de forma similar la expresión de proteínas relacionadas con el transporte de ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria.

5.- Estudiar en el mismo modelo in vitro del objetivo 4, si la presencia y ausencia de norepinefrina durante la reducción de temperatura en el tejido adiposo marrón modifica de forma similar la expresión de proteínas relacionadas con la fosforilación oxidativa mitocondrial.

MATERIALES Y METODOS





14. MODELOS EXPERIMENTALES

Para la realización de los experimentos, se utilizaron dos modelos experimentales en conejo y rata.

14.1 MODELO EN CONEJO NEW ZEALAND

Para el estudio comparativo del metabolismo de la grasa blanca y marrón se realizó en conejos New Zealand machos (n=10; Granja Cunicular, Navarra, Spain) de peso 2.35 ± 0.023 kg. Los conejos se mantuvieron durante 8 semanas con libre acceso al agua. Los conejos fueron alimentados de forma controlada con una dieta estándar (80-100 g/día; SF412 PANLAB SLU, Barcelona, Spain). La tabla 1 muestra la composición de la dieta. Los conejos fueron mantenidos bajo temperatura fisiológica (23 ± 2 °C) en ciclos de noche día estándares de 12 horas de duración cada uno de ellos (12 horas luz/12horas noche). La comida de los conejos se retiró 24 horas antes de obtener la grasa parda y blanca.

	Composición Nutricional (%)
Proteínas	12.0
Minerales	6.5
Humedad	10.0
Lípidos	3.0
Fibra	16.0

Tabla 1. Composición de la dieta utilizada para alimentar a los conejos

Para la obtención de la grasa blanca y marrón de los conejos se realizó eutanasia mediante sobredosis de pentobarbital sódico (100-300 mg/kg peso corporal), que se administró a través de la vena marginal de la oreja. Los conejos fueron exsanguinados. Después de ser sacrificados, la grasa blanca se obtuvo de la región lumbar. Es importante señalar que los diferentes depósitos de grasa blanca pueden tener diferencias en su actividad metabólica. No obstante, se ha demostrado que la grasa blanca de la parte superior del cuerpo, incluida la región lumbar, proporciona la mayor cantidad de ácidos grasos no esterificados a nivel sistémico, lo que sugiere una mayor actividad metabólica. Los paquetes de grasa se pesaron y lavaron con solución salina y se congelaron a -80°C hasta su procesado.

El tejido adiposo marrón se obtuvo de la región interescapsular. Estos depósitos de grasa están anatómicamente bien definidos y son disecados fácilmente. Una vez obtenidos los fragmentos de grasa marrón, se lavaron con suero salino, se pesaron y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento para realizar las determinaciones moleculares.

14.2 MODELO EN RATA WISTAR

Con el fin de analizar si los efectos de la reducción de temperatura en la grasa marrón son o no totalmente dependientes de norepinefrina, se realizó un modelo de incubación *in vitro* donde evidentemente no puede existir estimulación adrenérgica a no ser que la noradrenalina se añada al medio de incubación. Para la realización de esta aproximación experimental se obtuvo tejido graso marrón de rata Wistar (214 ± 10 g de peso), de cuatro meses de edad.

Los animales fueron eutanasiados por sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico (100 mg/kg peso corporal) y exsanguinados mediante punción cardíaca. Después de ser sacrificados, se obtuvo la grasa marrón de los depósitos interescapsulares.

Los paquetes de grasa marrón aislados se lavaron con suero salino y se mantuvieron en una solución de Krebs–Henseleit que contenía: glucosa 5.5 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, NaCl 135 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgSO_4 1.2 mmol/L, CaCl_2 2 mmol/L, NaHCO_3 25 mmol/L, 0.25% albumina, 2×10^{-5} U/L penicilina y 2×10^{-5} $\mu\text{g/L}$ streptomycin con un pH 7.4.

El tejido adiposo marrón obtenido de las ratas se dividió en fracciones y cada una de ellas se incubó durante 24 horas en un incubador de células bajo atmósfera de 95% de O_2 /5% CO_2 a 37°C o a 32°C . También se incubaron segmentos de grasa marrón a 37°C con norepinefrina 10^{-6} mol/L. Esta concentración de norepinefrina se ha utilizado previamente por otros investigadores en células de grasa aisladas, e incluso para establecer líneas celulares con expresión elevada de UCP en las mitocondrias, y estimulación de adipogénesis en células de grasa marrón (51,52). Todas las determinaciones moleculares se realizaron en 6 experimentos diferentes bajo condiciones estériles.

Terminado el periodo de incubación, los segmentos de tejido graso marrón se congelaron rápidamente a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento.

Ambos estudios se realizaron siempre bajo la normativa Ética de la Institución y de la Comunidad Europea. Además ambos estudios forman

parte de un estudio general más amplio en el que se analiza el efecto de los polifenoles sobre la grasa y que fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense (Anexo I) (**número de código ES280790000086**).

15. DETERMINACIÓN EN CONEJOS DE PARÁMETROS METABÓLICOS CIRCULANTES.

Se obtuvieron muestras de sangre a través de un catéter insertado en la arteria marginal de la oreja de los conejos despiertos. La sangre se obtuvo en tubos de plástico que una vez obtenida la muestra se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo. Después, se centrifugaron los tubos a 1.500 g, y el suero se recolectó transfiriéndolo a tubos de polipropileno, almacenándose a -80°C hasta que se realizaran las determinaciones analíticas.

En el suero se determinó como variables analíticas: colesterol total, LDL-colesterol y HDL-colesterol mediante kits (Vitros Fusion 5,1, OrthoClinical Diagnostics, Johnson & Johnson, NJ, USA) basados en técnicas espectrofotométricas enzimáticas de colorimetría siguiendo las especificaciones de los fabricantes (SPINREACT, S.A. /S.A.U., Gerona, Spain y Biosystems. Barcelona, España)).

16. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS ANALIZADAS MEDIANTE WESTERN BLOT.

El nivel de expresión de las diferentes proteínas en los dos modelos experimentales se analizaron mediante Western blot. Para ello, las diferentes porciones de grasa se homogenizaron utilizando un Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke;GmbH & Co, Staufen, Germany) en un tampón que contenía 50 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl₂, 10% glycerol, 1% Triton-X-100 y una mezcla comercial de antiproteásicos (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

Las muestras de tejido graso homogeneizadas se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su análisis.

Para su análisis por Western blot, se cuantificó la cantidad de proteína de cada muestra mediante el método del reactivo de ácido bicinonínico, siguiendo las especificaciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL).

Las muestras fueron entonces sometidas a electroforesis desnaturalizante, como ha publicado previamente nuestro grupo (53,54,55). Para ello se realizaron geles de poliacrilamina SDS-PAGE 15% (w/v) en los que se cargó 20 µg de proteína de cada muestra en cada pocillo, solubilizadas en tampón Laemmli que contenía con un pH final de 6,8: 4% dodecil sulfato sódico (SDS), 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004 % azul de bromofenol y 125 mmol/L Tris-HCl.

Básicamente, el SDS confiere carga positiva a todas las proteínas. El agente detergente SDS dota a todas las proteínas en un intervalo regular, confiriendo a cada proteína la misma carga negativa total. Así conseguimos separar las proteínas por su tamaño y no por su carga. Por otro lado, el 2-mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro y permite que la proteína adquiera una conformación primaria y pueda entrar en el gel para su separación. El motivo de añadir azul de bromofenol es contar con una molécula de muy bajo peso molecular que permite que se cree un frente al aplicar la corriente en la cubeta de electroforesis y podamos conocer cuando llega al final del gel para la terminación de la separación de las

proteínas.

Una vez separadas las proteínas en el gel, estas se transferirán a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas se transfieren mediante electrotransferencia semihúmeda desde el gel de poliacríamida a una membrana de nitrocelulosa (Immobilion[®]-P, Millipore). Para ello, se utilizó un tampón de transferencia que contenía: 250 mmol/L de glicina, 15% de metanol, 25 mmol/L de Tris-HCl y agua destilada.

Tras realizar el blotting se bloquearon mediante la incubación con albumina de suero bovino (5% peso/volumen) en tampón Tris Buffered Saline-Tween (TBS-Tween-20) que contenía: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 5,2), 137 mmol/L NaCl y 0,1% Tween-20. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C. Mediante esta maniobra se evita que cuando los anticuerpos se incubaran con las membranas estos se unan de forma inespecífica a la membrana de nitrocelulosa.

Tras el periodo de incubación, las membranas se lavaron dos veces con tampón TBS y se incubaron con los diferentes anticuerpos específicos de cada una de las proteínas que se determinaron. En la tabla 2 se resumen los anticuerpos primarios y secundarios empleados.

Para la determinación del peso molecular de las bandas detectadas, se utilizaron también marcadores de peso molecular pre-teñidos (Sigma, St. Louis, MO).

Las membranas se lavaron con PBS al 0.5% de Tween (tres veces durante 5 minutos) para eliminar el anticuerpo primario no unido y, después, fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, que reconocían de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios fueron de origen animal: Ig G anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra, conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) (Tabla 2).

La unión antígeno anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia y se valoraron mediante densitometría. Para ello, se utilizó el sistema ECL[®] (Amersham Biosciences). Este sistema contiene un sustrato Lumigen[®] PS-3 que es convertido en un éster de acridinio cuando es catalizado por la peroxidasa de rábano. El éster reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas y emite luz.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Anticuerpo Primario	Tipo	Dilución final	Código	Anticuerpo conjugado con peroxidasa	Dilución final
Anti-CPT-I	Policlonal	1:1000	SC20670	IgG anti-conejo	1:2000
Anti-CPT-II	Policlonal	1:1000	SC20526	IgG anti-cabra	1:2000
1,6 bífosfato aldolasa	Policlonal	1:1000	SC12061	IgG anti-cabra	1:2000
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Monoclonal	1:1000	SC47724	IgG anti-ratón	1:2000
Malato deshidrogenasa mitocondrial	Monoclonal	1:1000	SC166687 ₉	IgG anti-conejo	1:2000
Malato deshidrogenasa citosólica	Policlonal	1:1000	SC49234	IgG anti-cabra	1:2000
Acil CoA deshidrogenasa	Policlonal	1:1000	SC1304	IgG anti-cabra	1:2000
Piruvato deshidrogenasa	Policlonal	1:1000	SC7140	IgG anti-cabra	1:2000
Lactato deshidrogenasa	Monoclonal	1:1000	SC133123	IgG anti-ratón	1:2000
UCP-1	Policlonal	1:1000	ab23841	IgG anti-conejo	1:2000
NADH deshidrogenasa	Monoclonal	1:1000	ab181848	IgG anti-conejo	1:2000
Citocromo C oxidasa	Monoclonal	1:1000	SC58613	IgG anti-ratón	1:2000
F1 ATP sintasa	Monoclonal	1:1000	Ab14705	IgG anti-ratón	1:2000
β-actina	Monoclonal	1:1500	A5441	IgG anti-ratón	1:2500

Nota: Todos los anticuerpos con código comenzando con el prefijo SC son de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA. Los anticuerpos con prefijo AB son de la casa comercial Abcam, Cambridge, UK y el de prefijo A de la casa comercial Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Como anteriormente se comentó, las imágenes se analizaron mediante densitometría que nos permite evaluar la cantidad relativa de la proteína a medir y cuantificar el resultado en términos de las unidades de medida internacional de densitometría (Unidades Arbitrarias de Densitometría (U.A.)) utilizando el software Quantity One®, Laboratorios Bio-Rad. Dicho software permite la adquisición, cuantificación y análisis de imágenes.

17. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LACTATO Y DE LAS ACTIVIDADES ACONITASA, LACTATO DESHIDROGENASA Y MALATO DESHIDROGENASA.

Como habíamos publicado previamente por nuestro laboratorio (56,57,58), el contenido de lactato en los tejidos grasos y las actividades de aconitasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa se determinaron mediante el uso de kits comerciales. Los kits comerciales utilizados fueron de la casa comercial BioVision Research Products, Mountain View, CA, USA. El kit para determinar la actividad lactato deshidrogenasa fue el de referencia K-726, para la actividad aconitasa el de referencia K-716 y para la actividad malato deshidrogenasa el de referencia K-654. La determinación del contenido de lactato se realizó con el kit K-627. Todos los kits fueron colorimétricos y se siguió para su realización las especificaciones del fabricante.

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media. El test estadístico empleado fue el test de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS (SPSS for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL, USA; versión 22.0).



RESULTADOS





19. METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA GRASA MARRÓN Y GRASA BLANCA DE CONEJO

En primer lugar se realizaron los experimentos diseñados para responder a los objetivos relacionados con la comparación del metabolismo energético en la grasa blanca y marrón en los conejos New Zealand en ayunas. En estos conejos se determinaron inicialmente una serie de parámetros bioquímicos circulantes que se representan en la tabla 3.

Tabla 3.- Características de niveles en suero de biomarcadores asociados con el metabolismo de lípidos y glucosa.

Lípidos	
LDL-colesterol (mmol/L)	0.15 ± 0.04
HDL-colesterol (mmol/L)	0.42 ± 0.02
Colesterol total (mmol/L)	0.66± 0.09
Trigliceridos (mmol/L)	0.82 ± 0.08
Glucosa	
Glucosa (mmol/L)	5.03 ± 0.22
Insulina (mU/L)	8.73 ± 0.97
Índice HOMA	1.99 ± 0.25

Abreviaciones: Índice HOMA: índice de evaluación de modelo homeostático. Resultados representados como media± error estándar de la media de 10 conejos.

El índice HOMA es un marcador que evalúa la resistencia a la insulina. Cuando el valor del índice HOMA es mayor de 3 hay riesgo de resistencia a la insulina. La fórmula del índice HOMA cuando la glucosa se da en mmol/L es glucosa x Insulina: En el caso de los conejos utilizados en los experimentos el índice HOMA fue menor de 3 lo que significa que no había resistencia a insulina.

20. NIVELES DE UCP-1 EN GRASA MARRÓN Y GRASA BLANCA

Se determinó en la grasa marrón y en la grasa blanca el nivel de expresión proteica de UCP-1.

Como se puede observar en la figura 10, la proteína UCP- 1 se expresó de forma marcada en el tejido adiposo marrón, pero el nivel de expresión en tejido adiposo blanco fue muy débil.

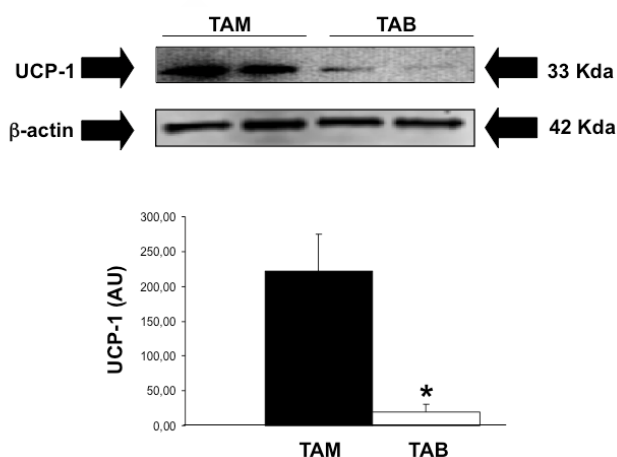


Figura 10.- Western blot representativo que muestra la expresión de UCP-1 en grasa marrón (TAM) y grasa blanca (TAB). Se utilizó la expresión de la proteína de UCP-1 para evaluar la pureza de los tejidos utilizados. La expresión de β-actina se utilizó como control de carga de cantidad de proteína. Los resultados densitométricos se representan como media ± error estándar de la media de 10 conejos diferentes. * P <0,05 respecto a TAM.

21. EXPRESIÓN DE ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN GRASA MARRÓN Y GRASA BLANCA

Una vez determinados los niveles de la proteína UCP-1 en ambos tipos de grasa, se analizaron los niveles de expresión de diversas proteínas implicadas en el metabolismo energético. En primer lugar se determinaron los niveles de expresión de las proteínas fructosa 1,6- bifosfato aldolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, dos enzimas glicolíticas.

Los niveles de expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fue significativamente mayor en TAB en comparación con el TAM (Figura 11). Los niveles de expresión de fructosa 1,6- bifosfato aldolasa también tendieron a ser mayores en TAB que en TAM, aunque los valores densitométricos no alcanzaron diferencias con significación estadística entre los grupos experimentales (Figura 11).

Se analizó también el nivel de expresión de la piruvato deshidrogenasa, una enzima que produce acetil CoA a partir de piruvato. Como se observa en la figura 11 también fue significativamente mayor en tejido adiposo blanco respecto al marrón.

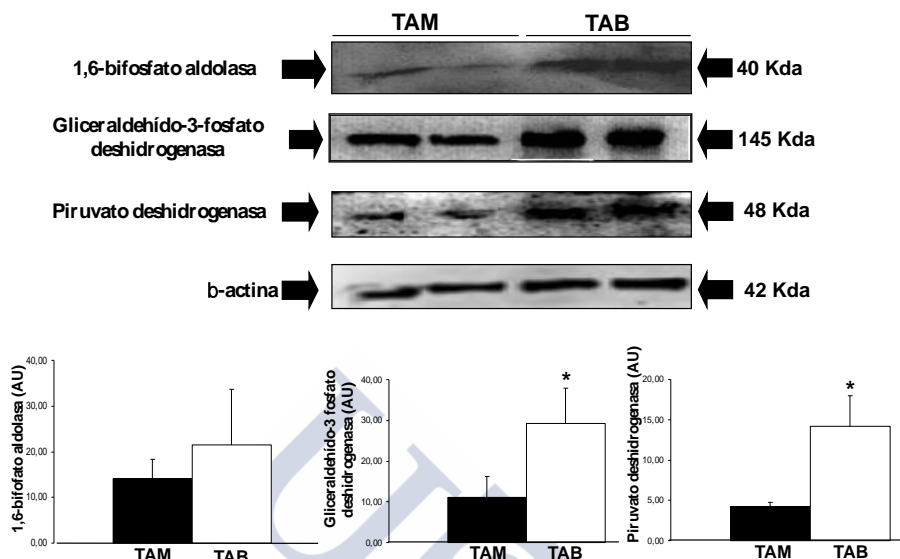


Figura 11.- Western blots representativos que muestran la expresión de enzimas implicadas en la glicólisis en tejido adiposo marrón (TAM) y tejido adiposo blanco (TAB) obtenidos de conejos New Zealand. En la parte superior se muestra un Western blots representativo de cada una de las proteínas estudiadas: 1,6 bifosfato aldolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa en TAM y TAB. La expresión de β -actina se utilizó como control de carga de cantidad de proteína. En la parte inferior, los gráficos de barras muestran el análisis densitométrico de todos los Western blots en unidades arbitrarias de densitometría (A.U.). Los resultados densitométricos se representan como media \pm error estándar de la media de 10 conejos diferentes. * $P < 0,05$ respecto a la expresión en TAM.

El nivel de expresión a nivel de proteína de los dos transportadores de ácidos grasos mitocondriales, CPT-I y CPT-II, también se determinó en los dos tejidos adiposos. En el TAM se observaron niveles más elevados de expresión de ambas proteínas, CPT-I y CPT-II, en comparación con el TAB (Figura 12). Además, el nivel de expresión de acil-CoA deshidrogenasa, enzima implicada en la β -oxidación de ácidos grasos, también fue mayor en TAM que en TAB (Figura 12).

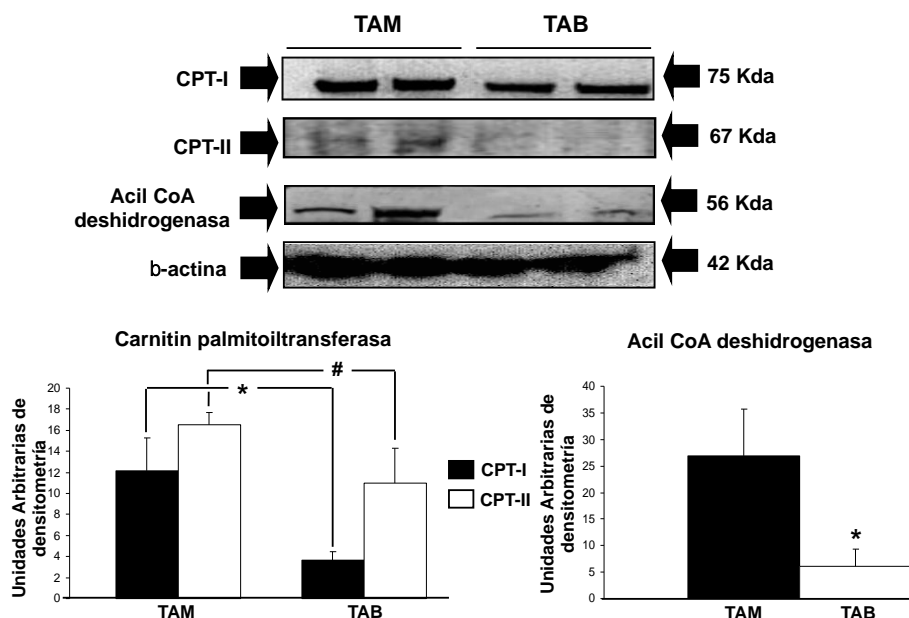


Figura 12.- Western blots representativos que muestran la expresión de los dos transportadores mitocondriales de ácidos grasos, CPT-I y CPT-II, y acil CoA deshidrogenasa, enzima implicada en la β -oxidación de los ácidos grasos en TAM y TAB. También se muestra la expresión de β -actina como control de carga de las proteínas en los geles.

En la parte inferior, los histograma de barras muestran el análisis densitométrico de todos los Western blots en unidades arbitrarias. Los resultados densitométricos se representan como media \pm error estándar de la media de 10 conejos diferentes. * P < 0,05 respecto al TAM.

Como muestra la figura 13, la expresión de malato deshidrogenasa citosólica fue mayor en tejido adiposo blanco que en el marrón, lo que se acompañó con una mayor actividad de malato deshidrogenasa en TAB en comparación con TAM (Figura 14). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la actividad aconitasa, enzima perteneciente al ciclo de Krebs, entre ambos tejidos adiposos (Figura 14).

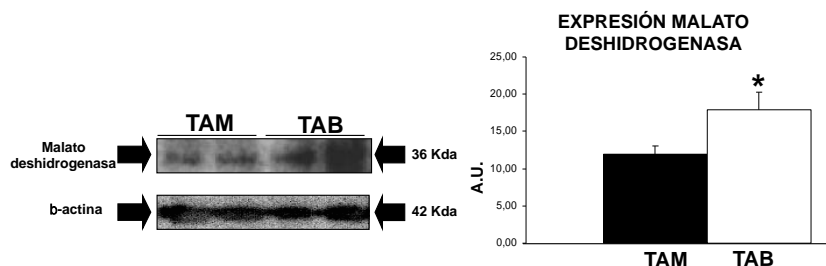


Figura 13.- Western blot representativo de la expresión de malato deshidrogenasa citosólica en TAM y TAB. La expresión de β -actina se utilizó como control de carga de proteína en los geles. En la parte derecha de la figura se muestran los resultados densitométricos de todos los Western blots de los diferentes animales representados en unidades arbitrarias de densitometría (A.U.). Los resultados densitométricos se expresan como media \pm error estándar de la media de 10 conejos diferentes. * $P < 0,05$ respecto al TAM.

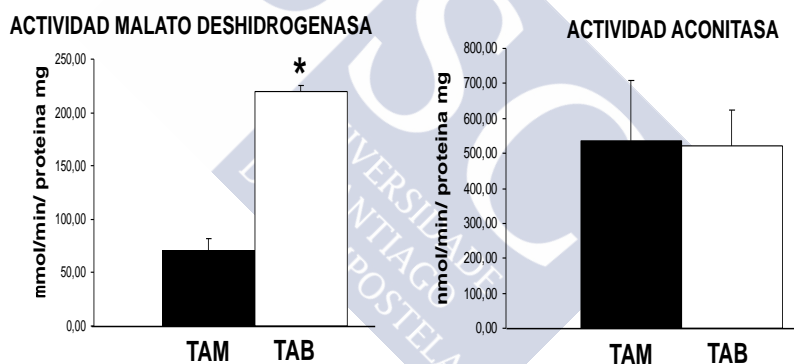


Figura 14.- Los histogramas muestran las actividades enzimáticas de aconitasa y malato deshidrogenasa en TAM y TAB. Los resultados se representan como media \pm error estándar de la media de 10 conejos diferentes. * $P < 0,05$ respecto TAM.

22. METABOLISMO ANAERÓBICO EN LA GRASA MARRÓN Y EN LA GRASA BLANCA

A continuación se analizaron enzimas relacionadas con el metabolismo anaeróbico. Para ello se determinó la expresión de lactato deshidrogenasa. Como se muestra en la figura 15, la expresión de lactato deshidrogenasa fue mayor en TAM que en TAB.

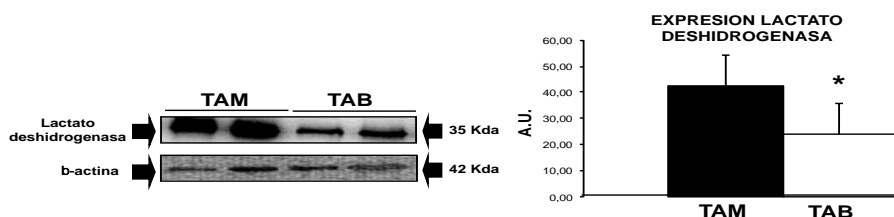


Figura 15.- Western blot representativo de la expresión de lactato deshidrogenasa en TAM y TAB. La expresión de β -actina se utilizó como control de carga de proteína en el gel. A la derecha se representan los valores medios densitométricos en unidades arbitrarias de densitometría (A.U.) de la grasa obtenida de todos los conejos. Los resultados se representan como media \pm error estándar de la media de 10 conejos diferentes. * $P < 0,05$ respecto TAM.

Este aumento en la expresión de lactato deshidrogenasa se vió acompañado con una mayor acumulación de lactato en TAM que en TAB (Figura 16). Sin embargo, la actividad lactato deshidrogenasa fue similar en ambos tejidos adiposos (Figura 16).

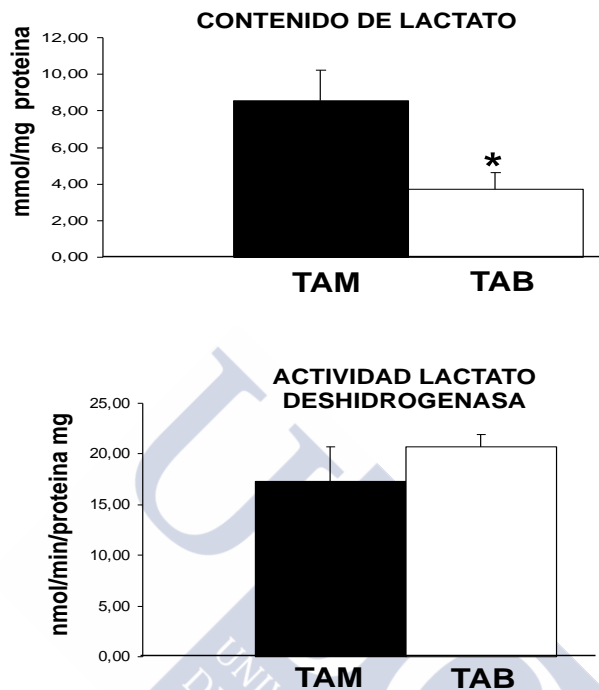


Figura 16.- Los histogramas muestran el contenido de lactato y la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa en TAM y TAB. Los resultados se representan como media \pm error estándar de la media de 10 conejos diferentes. * $P < 0,05$ respecto TAM.

23. EFECTO COMPARATIVO DE LA NOREPINEFRINA Y LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN LA GRASA MARRÓN.

23.1 EFECTO DE LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA (32°C) EN TEJIDO GRASO MARRÓN

Si lo comparamos con el tejido adiposo marrón incubado a 37°C, el TAM incubado a 32°C demostró tener una expresión significativamente mayor de los dos transportadores de ácidos grasos al interior de la mitocondria (CPT-I y CPT-II) que el TAM incubado a 37°C (Tabla 4 y Figura 17).

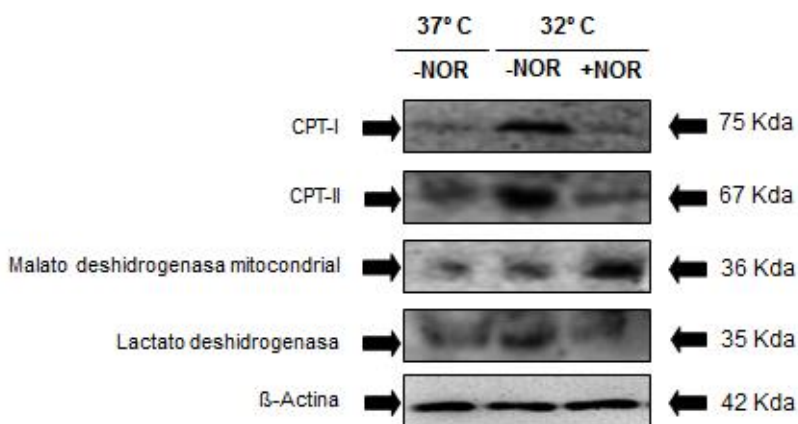


Figura 17.- Westerns blots representativos de la expresión de proteínas implicadas en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria (CPT-I y CPT-II), de la malato deshidrogenasa mitocondrial y de la lactato deshidrogenasa. La expresión de β-actina se utilizó como control de carga de proteína en el gel. **Abreviaciones:** CPT: carnitin palmitoiltransferasa; NOR: norepinefrina

El nivel de expresión proteica de la malato deshidrogenasa mitocondrial no alcanzó diferencias significativas entre las muestras de TAM incubadas a

37°C que las incubadas a 32°C (Figura 17 y Tabla 4).

Tabla 4.- Efecto en tejido adiposo marrón (TAM) de la reducción de temperatura en presencia y ausencia de 10⁻⁶ mol/L norepinefrina (NOR) sobre la expresión de proteínas asociadas al metabolismo energético.

Variable	Incubación a 37° C	Incubación a 32° C	
	-NOR	-NOR	+NOR
CPT-I	23.78±2.45	49.66±6.51*	17.55±3.64†
CPT-II	10.44±2.80	31.83±5.99*	14.75±3.96†
Malate deshidrogenasa mitocondrial	21.25±3.65	27.30±8.23	73.29±9.20*†
Lactato deshidrogenasa	25.41±3.69	43.23±6.43*	23.12±2.75†

Nota: Los datos expresan unidades arbitrarias de densitometría como media ± error estándar de la media de seis experimentos diferentes. * $p < 0.05$ respecto a TAM incubado a 37° C-. † $p < 0.05$ en relación a TAM incubado a 32°C en ausencia de norepinefrina. **Abreviaciones:** CPT: carnitin palmitoiltransferasa; NOR: norepinefrina.

La expresión de lactato deshidrogenasa fue significativamente mayor en TAM incubado a 32°C comparado con el TAM incubado a 37°C (Figura 17 y Tabla 4). Esto se acompañó de una actividad lactato deshidrogenasa mayor en el TAM incubado a 32°C que el incubado a 37°C (Figura 18).

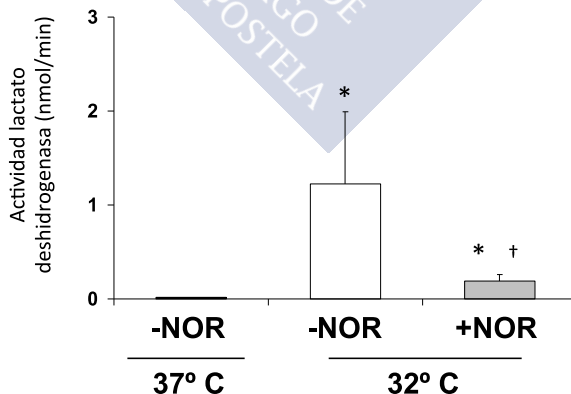


Figura 18.- Actividad lactato deshidrogenasa en el tejido adiposo marrón (TAM). Los datos se representan como media ± error estándar de la media de seis experimentos diferentes. * $p < 0.05$ respecto a TAM incubado a 37° C-. † $p < 0.05$ en relación a TAM incubado a 32°C en ausencia de norepinefrina.

También se analizaron los posibles cambios en el nivel de expresión de enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial. Si lo comparamos con el TAM incubado a 37°C, el TAM incubado a 32°C mostró una expresión mayor de UCP-1 y una menor expresión de la cadena α de la F1 ATP sintasa (Figura 19 y Tabla 5).

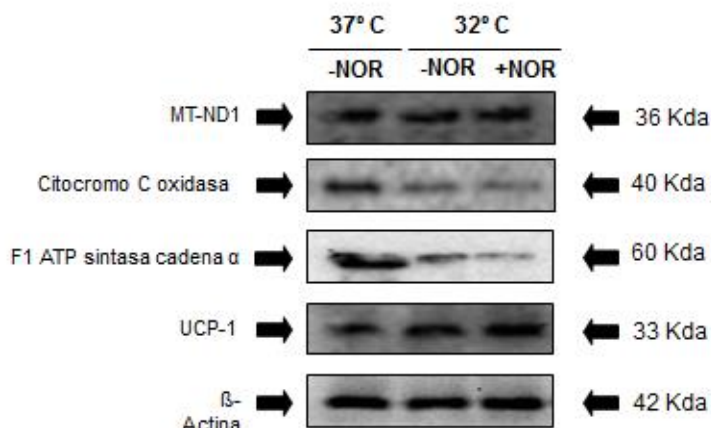


Figura 19.- Westerns blots representativos de la expresión de proteínas implicadas en la cadena respiratoria mitocondrial en tejido graso marrón incubado a 37°C o a 32°C en presencia o ausencia de norepinefrina (10⁻⁶ mol/L, NOR.)

Los niveles de expresión de la enzima citocromo c oxidasa y de la NADH deshidrogenasa (Complejo I de la cadena respiratoria, NADH:ubiquinona oxidoreductasa, MT-ND1) fueron similares entre el tejido graso marrón incubado a 37°C y el incubado a 32°C.

23.2 COMPARACIÓN ENTRE TEJIDO ADIPOSO MARRÓN INCUBADO A 37°C Y EL INCUBADO A 32°C CON NOREPINEFRINA.

Con el fin de determinar si la presencia de norepinefrina en el tejido adiposo marrón ejercía algún adicional a la reducción de temperatura, realizamos una serie de experimentos incubando TAM a 32°C con norepinefrina (10⁻⁶ mol/L).

Los niveles de expresión de CPT-I y CPT-II no fueron significativamente diferentes entre el TAM incubado a 37°C y el incubado a 32°C con norepinefrina (Figura 17 y Tabla 4). El nivel de expresión de

la lactato deshidrogenasa también fue similar entre el TAM incubado a 37°C y el incubado a 32°C con 10^{-6} mol/L norepinefrina (Figura 17 y Tabla 4). Sin embargo, la actividad de lactato deshidrogenasa fue ligeramente mayor, alcanzó significación estadística, en el TAM expuesto a 32° C con norepinefrina que el incubado a 37°C (Figura 18).

Los segmentos de TAM incubados a 32°C con norepinefrina demostraron tener una expresión mayor de malato deshidrogenasa mitocondrial que los incubados a 37°C (Figura 17 y Tabla 4).

Posteriormente se compararon los niveles de expresión de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial.

En comparación con los experimentos realizados a 37°C, las muestras de TAM incubadas con 32°C y norepinefrina (10^{-6} mol/L) mostraron una expresión mayor de UCP-1 y una expresión menor de la cadena α de la F₁ ATP sintasa (Figura 19 y Tabla 5).

Tabla 5.- Efecto en tejido adiposo marrón (TAM) de la reducción de temperatura en presencia y ausencia de 10^{-6} mol/L norepinefrina (NOR) sobre la expresión de proteínas asociadas al metabolismo energético.

Variable	Incubación at 37° C	Incubación a 32° C	
	-NOR	-NOR	+NOR
MT-ND1	11.35±2.23	10.58±2.14	9.86±2.64
Citocromo C oxidasa	21.19±4.18	15.82±6.27	12.02±2.56*
F ₁ ATP sintasa mitocondrial cadena α	53.59±7.64	25.66±4.63*	22.66±6.21*
UCP-1	241.19±98.08	352.84±129.58*	421.62±137.90*

Los datos expresan unidades arbitrarias de densitometría como media \pm error estándar de la media de seis experimentos diferentes. * $p < 0.05$ respecto a TAM incubado a 37° C-. † $p < 0.05$ en relación a TAM incubado a 32°C en ausencia de norepinefrina. Abreviaciones: MT-ND1: NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa.

La expresión de citocromo c oxidasa estaba reducida en los TAM incubados a 32°C con norepinefrina en comparación con los incubados a 37°C (Figura 19 y Tabla 5). La expresión de NADH deshidrogenasa fueron similares entre el tejido graso marrón incubado a 37°C y el incubado a 32°C con norepinefrina (Figura 19 y Tabla 5).

23.3 COMPARACIÓN ENTRE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS A 32°C EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE NOREPINEFRINA.

Como la figura 17 y la tabla 4 muestran, la expresión de CPT-I y CPT-II fueron significativamente mayores en TAM incubado a 32°C sin norepinefrina que las incubadas a 32°C pero con norepinefrina (10^{-6} mol/L).

La expresión y la actividad de la lactato deshidrogenasa fueron significativamente mayores en TAM expuesto a 32° C que en los expuestos a 32° C incubados con norepinefrina (Figuras 17 y 18 y Tabla 4). Sin embargo, el nivel de expresión de la malato deshidrogenasa mitocondrial en TAM expuesto a 32°C y norepinefrina fue significativamente mayor que en los incubados a 32°C sin norepinefrina (Figura 17 y Tabla 4).

En cuanto a los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial, los niveles de expresión de UCP-1 y de la cadena α de la F1 ATP sintasa fueron similares entre los dos grupos experimentales (Figura 19 y Tabla 5). Por otra parte, el nivel de expresión de la NADH deshidrogenasa (MT-ND1) también fue similar entre los TAM incubados a 32°C en presencia o ausencia de norepinefrina (Figura 19 y Tabla 5).

El nivel de expresión de la citocromo c oxidasa fue similar en las muestras de TAM incubadas en presencia o ausencia de norepinefrina, aunque el TAM incubado a 32°C y norepinefrina mostró una reducción significativa de la expresión de citocromo C oxidas respecto al TAM incubado a 37°C (Figura 19 y Tabla 5).



DISCUSIÓN





En la primera parte de este trabajo de tesis se demuestra por primera vez que, en condiciones normales de temperatura (23 ± 2 °C) y tras un periodo de 24 horas de ayuno, la expresión y actividades de las proteínas asociadas con la gluconeogénesis está aumentada en tejido adiposo blanco respecto al tejido adiposo marrón. Sin embargo, en el TAM se observó una mayor expresión de los dos principales transportadores de ácidos grasos en la mitocondria, el CPT-I y el CPT-II, y la acil CoA deshidrogenasa, enzima involucrada en la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, al compararlas con la expresión encontrada de estas mismas proteínas en el TAB.

24. DIFERENCIAS EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA β - OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

La β -oxidación de los ácidos grasos es un proceso catabólico en el que los ácidos grasos sufren la eliminación de un par de átomos de carbono en cada ciclo de la oxidación hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas acetil-CoA. Antes de que la β -oxidación de los ácidos grasos ocurra, los ácidos grasos necesitan ser activados, a través de la unión a la Coenzima A (CoA) (86). La reacción del ácido graso con la coenzima A para formar Acil-CoA la cataliza la enzima Acil-CoA-sintetasa.

La β -oxidación de los ácidos grasos se produce en el interior de las mitocondrias. Para transportar los ácidos grasos al interior de la mitocondria, se necesita la participación de moléculas transportadoras (87). Para ello, el ácido graso es transferido a un aminoácido llamado carnitina a través de la carnitina palmitoiltransferasa I, o CPT-I. En la membrana mitocondrial interior está la carnitina palmitoiltransferasa II, o CPT-II, que transfiere el resto acil de la carnitina a una coenzima A, en la matriz mitocondrial (88). Una vez en el interior mitocondrial, el ácido graso va a entrar dentro del ciclo de la β -oxidación propiamente dicha, degradándose el ácido graso a moléculas de acetil-CoA. El proceso de la β -oxidación de

los ácidos grasos se basa en cuatro pasos que se repiten consecutivamente hasta que toda la molécula de acil-CoA ha sido degradada en moléculas de acetil-CoA, que, finalmente, entrarán en el ciclo de Krebs para producir energía (87,88).

En los experimentos realizados, observamos que, además de aumentar la expresión de CPT-I y CPT-II, también estaba incrementada la expresión de acil-CoA deshidrogenasa, enzima implicada en el ciclo de la β -oxidación, en la grasa parda con respecto a la grasa blanca. Tomando todos estos datos conjuntamente para su consideración, los resultados indicarían que para el metabolismo de los ácidos grasos, parece que está más preparada la grasa parda que la grasa blanca. En este mismo sentido, mientras que el TAB podría considerarse un órgano endocrino y de almacenamiento de nutrientes, fundamentalmente ácidos grasos, para liberarlos cuando el aporte de alimentos esté reducido, el TAM no solamente almacena nutrientes, sino también es capaz de consumir lípidos y carbohidratos para defender al animal contra el frío.

Estos resultados podrían también tener relación con que el TAM sea un tejido más rico en mitocondrias que el TAB. Además, el aumento de CPT-II, CPT-I y acil-CoA deshidrogenasa en el TAM respecto al TAB, puede tener también relación con la observación publicada de que los ácidos grasos son activadores de UCP-1 (90). Además, cuando el TAM es activado se ha demostrado que se convierte en un importante consumidor de ácidos grasos. Pero también, el TAM tiene un papel importante en el aclaramiento de los triglicéridos que se encuentran en plasma (91,92). Por otro lado, también se ha sugerido que durante el fenómeno de la termogénesis se produce un aumento en la liberación de ácidos grasos libres, lo que, además, sugeriría que TAM tiene un papel importante como suministrador de estos ácidos grasos a otros tejidos (93,94).

25. DIFERENCIAS EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ANAERÓBICO.

En este mismo grupo de experimentos realizados en los tejidos grasos del conejo New Zealand, determinamos también si existían diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo anaeróbico entre el tejido adiposo marrón respecto al tejido adiposo blanco. En los experimentos observamos que el TAM tenía una expresión más alta de lactato deshidrogenasa y contenido de lactato, en relación con el observado en el TAB. Estos resultados sugerirían que en el TAM el metabolismo anaeróbico podría estar favorecido en comparación con el TAB. En este sentido, el aumento en contenido de lactato en el TAM respecto al TAB parecía que se debía fundamentalmente a un aumento en la expresión de lactato deshidrogenasa más que a un cambio en la actividad de esta enzima.

En relación con estas observaciones sobre el diferente contenido de lactato en el TAB y en el TAM, el hecho de que la expresión de la enzima piruvato deshidrogenasa, una de las enzimas incluidas en el complejo piruvato deshidrogenasa que actúa al final de la vía glicolítica y que interviene en la conversión de piruvato en acetil-CoA, fuera significativamente mayor en TAB que en TAM podría influir en el aumento de la expresión de lactato deshidrogenasa en TAM con respecto a la encontrada en TAB.

Esto es fácilmente explicable ya que si en el TAM el piruvato tendría limitada su capacidad de conversión a acetil CoA por déficit de piruvato deshidrogenasa, y por lo tanto, es probable que se esté favorecida la vía de conversión de piruvato en lactato por la lactato deshidrogenasa. También, en esta misma línea de pensamiento, es posible que un déficit de piruvato deshidrogenasa estimule en la célula un aumento de expresión de lactato deshidrogenasa como mecanismo compensador con el fin de eliminar piruvato. De hecho, la deficiencia de piruvato deshidrogenasa ha sido previamente asociado con acidosis láctica (95).

Pero volvamos al metabolismo de los ácidos grasos. El contenido de lactato, como ya hemos indicado anteriormente, era mayor en el TAM que en el TAB. Entonces, podría ocurrir que la β -oxidación aeróbica de los

ácidos grasos como combustible energético para la actividad del TAM durante periodos de ayuno y temperatura normal, sea menos importante que lo que inicialmente podríamos haber pensado. Por lo tanto, aunque en estas condiciones de ayuno y temperatura fisiológica TAM esté preparado desde el punto de vista de la maquinaria metabólica enzimática para una activa oxidación de los ácidos grasos, TAM utilice en estas condiciones el metabolismo anaeróbico mejor que el aeróbico para producir energía. No obstante, el hecho de que diferentes proteínas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos estén aumentadas en su nivel de expresión en TAM puede reflejar también que este tejido esté preparado para rápidamente utilizar esta vía metabólica cuando lo requiera, por ejemplo, en condiciones de frío. En este sentido, ha sido publicado por varios investigadores que la activación simpática del TAM regula al alza la oxidación de ácidos grasos aumentando la lipólisis y la actividad de los transportadores de ácidos grasos a la mitocondria (96,97).

También hay que señalar que es bien conocido que el proceso de la termogénesis en el adipocito marrón puede ser mimetizado simplemente añadiendo ácidos grasos (97). Por lo tanto, la activación de la lipólisis podría ser un “disparador” suficientemente potente para iniciar el proceso de la termogénesis en el adipocito marrón. En este sentido, es también posible que bajo condiciones de temperatura fisiológica ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) y ayuno, y para mantener un adecuado nivel del almacén intracelular de triglicéridos, el TAM utilice el lactato para formar nuevos ácidos grasos que pudieran ser esenciales durante la activación de TAM. De acuerdo con esta hipótesis, previamente se ha publicado que en TAM el lactato puede convertirse en ácidos grasos en ratas sometidas a ayuno-realimentación (98).

26. LA GLUCOSA EN EL TAM Y EN EL TAB

La glucosa es un componente esencial del metabolismo del tejido adiposo (99,100). En nuestro estudio, en los conejos sometidos a 24 horas de ayuno y temperatura fisiológica, en su TAB se observó una expresión mayor de una de las principales enzimas implicadas en la glicolisis, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que la expresión de esta enzima observada en el TAM. Además, como se ha mencionado anteriormente, la expresión de

piruvato deshidrogenasa también fue significativamente mayor en TAB que en TAM. En conjunto, estos resultados pueden sugerir inicialmente que bajo condiciones de temperatura fisiológica y de ayuno, TAB puede tener una tasa mayor de degradación de la glucosa que TAM. Además, este posible favorecimiento del catabolismo oxidativo de la glucosa en TAB en condiciones de ayuno podría ser subsecuente a una aceleración de la lipólisis, ya que es bien conocido que la lipólisis está estimulada en TAB durante condiciones de ayuno (10). No obstante, estudios previos han sugerido que en condiciones de ayuno en animales de experimentación, TAB muestra una reducción reversible de los transportadores de glucosa estimulados por insulina, lo que reduce la oxidación de la glucosa. Es interesante aquí señalar que se ha publicado que la unión de insulina al adipocito del TAB aumenta en condiciones de ayuno (102).

Los resultados de nuestro trabajo también pueden sugerir que en el TAB obtenido de conejos bajo condiciones de temperatura fisiológica y ayuno, el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) estaba aumentado al compararlo con el TAM. En este sentido, aunque la actividad aconitasa, enzima implicada en el ciclo del ácido tricarboxílico, fue similar en TAB y TAM, sin embargo, se observó un aumento en la expresión de malato deshidrogenasa y de su actividad en TAB respecto al TAM. No obstante, la malato deshidrogenasa no solo tiene un papel importante en la formación de citrato en el ciclo del ácido tricarboxílico en el interior de la mitocondria.

En el tejido adiposo, y en otros tejidos, existe otra actividad malato deshidrogenasa que está localizada en el citoplasma del adipocito, y que tiene como función reducir en el citoplasma el oxalacetato a malato liberando NAD^+ (Figura 20).

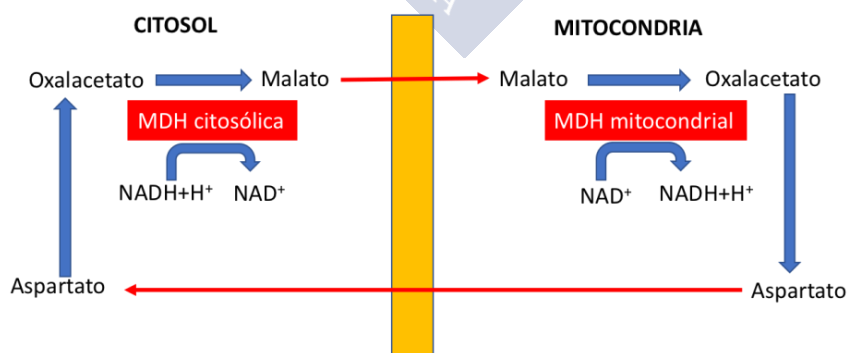


Figura 20.- Lanzadera del malato. Abreviatura: MDH: malato deshidrogenasa

En el citoplasma, la malato deshidrogenasa forma parte de la lanzadera malato-aspartato que está implicada en la gluconeogénesis (103). En nuestros experimentos se utilizó un anticuerpo que específicamente reconocía la región N-terminal de la isoforma malato deshidrogenasa citosólica. Es decir, la diferencia de expresión observada en la malato deshidrogenasa entre el TAB y el TAM fue debida a cambios en la isoforma de la malato deshidrogenasa citosólica que participa en la lanzadera malato-aspartato.

Si consideramos entonces en su conjunto los resultados obtenidos, estos sugieren que la lanzadera malato-aspartato estaría aumentada en TAB respecto al TAM, en condiciones normales de temperatura y en el periodo de 24 horas de ayuno. La pregunta que entonces surge ante estos resultados es ¿por qué en TAB está aumentada la expresión de la isoforma malato deshidrogenasa citosólica y la actividad total de malato deshidrogenasa después de 24 horas de un periodo de ayuno y en condiciones de temperatura fisiológica?.

La malato deshidrogenasa participa en sacar oxalacetato fuera de la mitocondria, ya que el oxaloacetato no puede dejar la mitocondria. Esto es potencialmente importante porque muchas de las enzimas gluconeogénicas están localizadas en el citoplasma de la célula. Además, en el citoplasma, el oxalacetato puede ser convertido a malato, pero también convertirse en fosfoenolpiruvato (104) y ser utilizado en la vía gluconeogénica, participando así en la síntesis de glucosa (Figura 21).

Es importante aquí señalar, que en los resultados obtenidos la enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa estaba aumentada en TAB respecto al TAM. La enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa está implicada tanto en la glicolisis como en la gluconeogénesis. Además, el nivel de expresión de 1,6 bifosfato aldolasa, enzima también implicada en ambas vías metabólicas, glicolisis y gluconeogénesis, tendió a ser mayor su expresión en TAB con respecto a TAM, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Evidentemente, todos estos resultados abrirían la pregunta sobre su significado fisiológico.

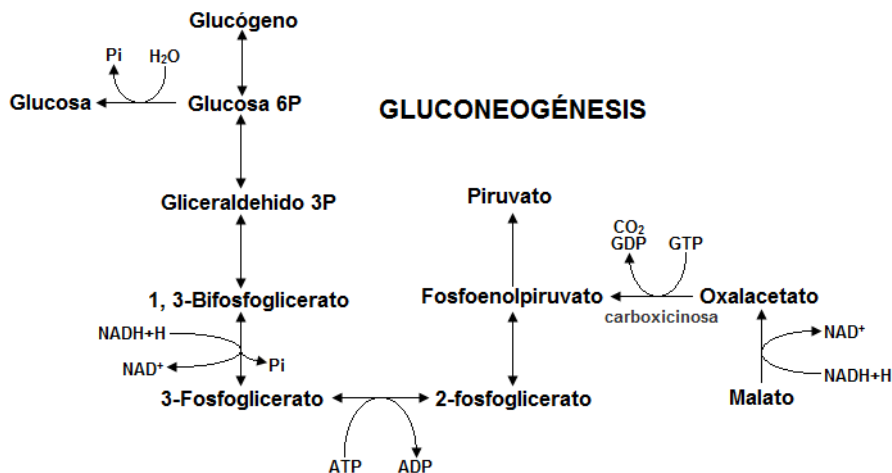


Figura 21.- Conversión de oxalacetato en fosfoenolpiruvato para ser dirigido hacia la vía gluconeogénica

Se ha demostrado previamente, y está bien establecido, que cuando la disponibilidad de glucosa aumenta la oxidación de los ácidos grasos disminuye y viceversa (105,106). Por lo tanto, se podría especular, en relación a los resultados obtenidos, que después de 24 horas de un periodo de ayuno, se podría favorecer el proceso de gluconeogénesis en el TAB como mecanismo compensador del aumento de la degradación de triglicéridos y, por lo tanto, de la depleción de sus depósitos en el TAB.

Como resumen de esta primera parte de resultados de este trabajo podríamos decir que se describe, en nuestro conocimiento por primera vez, que en conejos sometidos a temperatura fisiológica y un periodo de ayuno de 24 horas, el TAM parece tener favorecida la formación de lactato, lo que sugeriría un metabolismo anaeróbico como fuente de energía. Esto ocurriría a pesar de tener también una marcada expresión de enzimas relacionadas con el transporte de los ácidos grasos a la mitocondria, además de la enzima acil-CoA deshidrogenasa, enzima implicada en la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga.

Por otro lado, en el TAB, de estos mismos conejos, parece existir un aumento en la expresión enzimática de la lanzadera malato-aspartato y la vía gluconeogénica.

27. ¿SON SIMILARES LOS EFECTOS DE LA NOREPINEFRINA Y LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRÓN?

Como hemos comentado en la introducción, las modificaciones en el TAM relacionadas con la termogénesis sin temblor se habían relacionado de forma directa con la liberación y acción de la norepinefrina sobre el TAM. Por lo tanto, en la segunda parte de este trabajo de tesis analizamos las diferencias y similitudes que la reducción de temperatura y la norepinefrina producen sobre el TAM. Este grupo de experimentos se realizaron en TAM obtenidos de rata Wistar macho e incubados in vitro a 37°C y 32°C en presencia de norepinefrina.

En nuestro conocimiento, los experimentos realizados in vitro de este trabajo de tesis sugieren por primera vez que, independientemente de la norepinefrina, la reducción de la temperatura por sí misma promueve cambios en los niveles de expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo energético. Además, la presencia de norepinefrina en el TAM expuesto a la reducción de la temperatura también indujo cambios en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo energético que en algunos casos fueron diferentes a las producidas por la reducción de temperatura en presencia de norepinefrina.

27.1 EFECTOS DE LA REDUCCIÓN DE TEMPERATURA EN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN TAM

La reducción de temperatura en el TAM obtenido de rata Wistar aumentó el nivel de expresión de los transportadores de ácidos grasos mitocondriales, CPT-I y CPT-II, que como anteriormente hemos señalado, son dos pasos obligatorios para la oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga. Está suficientemente bien establecido que el TAM está densamente contenido con mitocondrias y que se requiere oxidación de ácidos grasos para alimentar la generación de calor (107). Estudios previos habían demostrado que la exposición al frío del TAM causa captación de

ácidos grasos no esterificados en plasma y lipólisis, lo que aumenta el suministro de ácidos grasos para su oxidación (108). En este sentido, la importancia que los transportadores de ácidos grasos mitocondriales y la oxidación de ácidos grasos tienen para estimular la producción de calor bajo condiciones de reducción de temperatura en el TAM está apoyada por el hecho de que ratones deficientes de CPT-II (CPT2A - / -) no pueden generar calor y/u oxidar ácidos grasos en el TAM (109). En relación con esta observación, se ha demostrado que los ácidos grasos libres son uno de los principales estimuladores de UCP-1 para promover termogénesis (110,111). La capacidad de los ácidos grasos de desacoplar la fosforilación oxidativa fue inicialmente descrita por Pressman y Lardy en el año 1956 (111). Sin embargo, el mecanismo por el que los ácidos grasos estimulan a la UCP-1 no está bien establecido. Hay autores que sugieren que los ácidos grasos actúan como sustrato de UCP-1 y otros sostienen que son cofactores de esta enzima (97,111,112,113). Incluso se ha considerado que los ácidos grasos cambian la conformación de UCP-1, estimulando su actividad (114).

El aumento en la expresión de CPT-I y CPT-II que se observó al incubar el TAM a una temperatura menor (32°C) puede sugerir un aumento en el transporte de ácidos grasos libres a las mitocondrias, lo que podría estar asociado con la expresión aumentada de la proteína UCP-1, y por lo tanto relacionado con la capacidad estimuladora de los ácidos grasos sobre la UCP-1 (112,113,114).

El diseño experimental de este trabajo de tesis no nos permite determinar los mecanismos por los cuales la reducción de la temperatura aumentó la expresión de UCP-1 en el TAM, de forma independiente de norepinefrina. Sin embargo, es probable que esté relacionado con un mayor transporte y oxidación de ácidos grasos mitocondriales comentado anteriormente. Sin embargo, es también importante señalar que no podemos descartar que otros mecanismos puedan estar implicados en la estimulación de la expresión de UCP-1 en el TAM, después de la reducción de temperatura, en el TAM de forma no dependiente a norepinefrina. Como ejemplo, Ma et al demostraron en ratones que, independientemente de la estimulación con norepinefrina, el UCP-1 se expresaba más por aumento en el TAM del receptor específico transitorio de melastatina-8 (TRPM8) (115). El TRPM8 puede ser activado por frío (116,117). Así, ratones que no expresan TRPM8 tienen una respuesta deficiente al frío, lo que indicaría que esta proteína juega un papel fisiológico importante en la detección y respuesta a reducción de temperatura en mamíferos (116,117,118). Son, no

obstante, necesarios más estudios para analizar con mayor profundidad los mecanismos involucrados en los cambios ejercidos sobre la expresión de UCP-1 por la reducción de temperatura sin norepinefrina en el TAM.

Como anteriormente se explicó, está bien establecido en la literatura publicada que el UCP-1 activo disipa el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo que conduce a la producción de calor a expensas de reducción en la síntesis de ATP (119,120). Sin embargo, en nuestro conocimiento, se ha estudiado en menor medida si en el TAM la reducción de la temperatura puede modificar el nivel de expresión de proteínas que formen parte de la cadena respiratoria mitocondrial. A este respecto, una observación interesante derivada de nuestros resultados fue que, además de aumentar la expresión de UCP-1, la exposición de TAM a menor temperatura produjo un descenso significativo de la expresión de la proteína ATP sintasa mitocondrial F1. Esta proteína es la encargada de generar ATP de tal forma que de cada 3 protones generados en la cadena respiratoria se genera una molécula de ATP (121,122).

La reducción de ATP sintasa mitocondrial F1 en condiciones de menor temperatura (32°C) probablemente ocurre para facilitar más la fuga de protones hacia la actividad UCP-1 y producir calor, en lugar de ser utilizado a través de la ATP sintasa mitocondrial para generar ATP.

Es importante aquí también señalar que en ratones knock-out para UCP-1 sus consecuencias se han atribuido casi exclusivamente sobre la termogénesis. No obstante, puede haber otras consecuencias sobre la biología y funcionalidad mitocondrial y, particularmente, sobre la generación de radicales libres del oxígeno (ROS). Por ejemplo, Kazak y cols (123) exploraron las diferencias moleculares inducidas por frío en TAM que carecía de UCP-1. En este estudio se demostró que el almacenamiento de calcio mitocondrial se ve comprometido a través de la producción de ROS de una manera dependiente de UCP-1, lo que demuestra que la eliminación de UCP-1 afecta a más funcionalidades celulares, además de a la termogénesis (123).

27.2 EFECTOS DE LA COMBINACIÓN NOREPINEFRINA+REDUCCIÓN DE TEMPERATURA

Estudios previos han señalado que los efectos estimulantes de la exposición al frío en TAM se imitaban mediante la estimulación eléctrica de los nervios simpáticos en el TAM. Por lo tanto, existe la noción de que hay una total dependencia de la estimulación simpática en el efecto termogénico en el TAM (71,124,125). Sin embargo, en este trabajo de tesis donde los

experimentos se realizaron *in vitro* con el TAM aislado, y por lo tanto sin innervación, los resultados obtenidos sugieren que la reducción de la temperatura en el TAM produce algunos efectos sobre los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, diferentes cuando los experimentos se realizaron en presencia o en ausencia de norepinefrina. En este sentido, hubo una serie de diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético en el TAM después de la reducción de temperatura por la presencia y ausencia de la noradrenalina:

La primera de estas observaciones fue el efecto diferente de la reducción de temperatura sobre la expresión de CPT-I y CPT-II en función de que la norepinefrina estuviera presente o no en el medio de cultivo.

En la mitocondria, la proteína CPT-I está localizada en la membrana externa mitocondrial. Como CPT-I es la primera etapa limitante en la entrada de ácidos grasos libres en la mitocondria, y como hemos comentado anteriormente para completar el transporte de los ácidos grasos al interior mitocondrial es necesaria la participación del CPT-II localizado en la membrana interna mitocondrial.

La observación de que la estimulación con norepinefrina del TAM expuesto a 32°C redujo la expresión de CPT-I y CPT-II, en comparación con la expresión observada en los experimentos realizados con reducción de la temperatura en ausencia de norepinefrina podría inicialmente parecer un resultado paradójico. Particularmente esto se debe a que diferentes trabajos han asociado la activación adrenérgica con un aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria (126). Sin embargo, la mayoría de estas conclusiones se obtuvieron de estudios experimentales realizados *in vivo* en los que evidentemente no se disociaron los efectos de la exposición en frío del TAM con la estimulación del sistema β -adrenérgico y, por lo tanto, del efecto de la norepinefrina. Además, en los estudios *in vivo*, otros factores podrían estar influyendo en los resultados. Sin embargo, los trabajos publicados también respaldaron la importancia de una mayor expresión de CPT-I para aumentar la actividad mitocondrial con el fin de producir calor mediante la activación del TAM (127).

Tomado en conjunto estos datos y antecedentes, se podría especular que, durante la reducción de la temperatura, la norepinefrina puede, de alguna manera, modular la absorción prolongada de ácidos grasos por parte de la mitocondria, incluso reduciéndola. Para entender esta especulación, es importante primero analizar los resultados obtenidos en los

experimentos de este trabajo de tesis sobre las proteínas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial.

La presencia de norepinefrina durante la reducción de temperatura en el TAM mantuvo la expresión aumentada de UCP-1 y la menor expresión de la subunidad F1 ATP sintasa mitocondrial que ya se había observado cuando el TAM fue incubado con una menor temperatura (32°C) pero sin norepinefrina. Además, la presencia de norepinefrina durante la exposición del TAM a la reducción de la temperatura también disminuyó el nivel de expresión de la proteína de la cadena respiratoria citocromo c oxidasa con respecto a la expresión de esta proteína observada en el TAM incubado a 37°C.

En condiciones fisiológicas, la enzima citocromo c oxidasa actúa como paso limitante de la cadena respiratoria. Así, la hipótesis de Kadenbach establece que la regulación del potencial de membrana y la formación de ROS en las mitocondrias están determinadas por la inhibición alostérica de citocromo C oxidasa inducida por ATP, y representa un mecanismo para el control respiratorio mitocondrial (128,129). En este sentido, se ha postulado que, en condiciones de estrés máximo, como la que se produciría en el TAM por la presencia de norepinefrina, cuando la temperatura se reduce aumenta el potencial de membrana mitocondrial, lo que incrementaría la formación de ROS por la mitocondria (130,131).

En este punto hay que señalar que existe la duda sobre si durante el proceso de la termogénesis en el TAM, los ROS actúan como reguladores de la función termogénica o meramente es un epifenómeno. Sin embargo, algunos estudios con ratones knockout para la isoforma de superóxido dismutasa mitocondrial, superóxido dismutasa 2, señalan que el aumento de ión superóxido en estos ratones aumenta el desacoplamiento mitocondrial, favoreciendo la formación de calor (132).

Por lo tanto, en el TAM expuesto a reducción de temperatura, el efecto de la norepinefrina reduciendo la expresión de citocromo C oxidasa puede actuar como un mecanismo de protección para reducir la capacidad de producción de ROS mitocondrial por la cadena respiratoria. En este sentido, se ha demostrado que la activación de la termogénesis en TAM aumenta los niveles de producción de ROS mitocondrial, y apoya la termogénesis dependiente de UCP-1 mejor que de la generación de norepinefrina (130,131).

El hecho de que la expresión de la isoforma malato deshidrogenasa mitocondrial aumentó en TAM estimulado por norepinefrina e incubado a 32°C, en comparación con el TAM expuesto solamente a reducción de

temperatura pero sin norepinefrina, puede estar reflejando que en condiciones de estrés máximo, es decir, reducción de temperatura + norepinefrina, el ciclo tricarboxílico podría intentar mantener un aumento en el suministro continuo de protones para ser usado por la actividad UCP-1 y poder mantenerse así la generación de calor; aún más cuando la enzima citocromo C oxidasa está regulada negativamente por norepinefrina.

Además de los ácidos grasos libres, en condiciones de temperatura reducida, la glucosa es otra fuente importante para producir calor en el TAM. Se ha demostrado que la utilización de glucosa por el TAM se mejoró notablemente después de la administración de agonistas beta-adrenérgicos (133,134). Es importante señalar que estos estudios han confirmado que la estimulación de los agonistas beta-adrenérgicos de la utilización de glucosa por el TAM dependía de la activación de UCP-1 (133,134). De hecho, se demostró que la activación de UCP-1 mejoró la tolerancia a la glucosa. Esto no solamente ocurre en el TAM sino también en el músculo esquelético (135).

Si consideramos en conjunto los resultados obtenidos, y en forma especulativa, es posible que después de la reducción de temperatura exista una expresión y/o actividad incrementada de UCP-1. En este momento, el metabolismo de los ácidos grasos puede ser la fuente principal de suministro de NADH y FADH₂ a la cadena respiratoria oxidativa mitocondrial. Sin embargo, cuando se libera norepinefrina, la fuente metabólica para mantener el calor es posible que se modifique hacia la vía de la glucosa. Por lo tanto, cuando la norepinefrina está ausente, los ácidos grasos libres soportarían la producción de calor por UCP-1 acompañada de una expresión y actividad de lactato deshidrogenasa aumentada. Sin embargo, cuando la norepinefrina está presente durante la reducción de la temperatura, puede estar ocurriendo un segundo paso, cambiando la fuente de producción de calor hacia el metabolismo de la glucosa y hacia el ciclo tricarboxílico. En este sentido, al reducirse la temperatura y aumentar la norepinefrina se favorecería el metabolismo de la glucosa por el ciclo tricarboxílico y para ello, se reduciría la expresión y actividad de lactato deshidrogenasa. Esto diferenciaría de forma importante el efecto del descenso de temperatura en ausencia o presencia de norepinefrina.

28. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y COMENTARIOS

En el presente trabajo de tesis hay que hacer una serie de consideraciones y analizar algunas limitaciones del mismo.

En primer lugar, en los experimentos realizados para comparar las modificaciones metabólicas entre el TAB y TAM, podemos considerar que podríamos haber incluido experimentos sometiendo a los conejos a menor temperatura y compararlos con los obtenidos en la grasa de los conejos mantenidos a 23°C. Sin embargo, la realización de esos experimentos en las instalaciones del animalario eran complejas ya que en la sala de mantenimiento de los conejos hay animales sometidos a otros diseños experimentales y grupos que requieren temperatura de 23°C y dificulta mucho la capacidad de realizar esa aproximación experimental.

En el estudio *in vitro* con TAM incubado en presencia de menor temperatura con o sin norepinefrina nos gustaría también hacer una serie de comentarios y consideraciones.

Como ya hemos comentado a lo largo de este trabajo, diferentes estudios en animales denervados han sugerido que las catecolaminas son responsables del aumento de la expresión de UCP-1 y por lo tanto de la termorregulación en el TAM (136). No obstante, existen datos contradictorios sobre si el sistema simpático es el único sistema implicado en la termogénesis o si otros sistemas no dependientes de norepinefrina podrían también estar implicados (137,138). Es en este punto interesante señalar que se ha demostrado aumento en la expresión de UCP-1 en animales denervados expuestos a condiciones de frío (137). Un estudio reciente también ha descrito que independientemente de la norepinefrina, la exposición al frío activó genes termogénicos en adipocitos aislados beige y blancos (138).

Aunque somos conscientes que los estudios *in vitro* pueden no representar estrictamente un sistema fisiológico, los estudios *in vitro* en el TAM, como los que hemos realizado en este trabajo de tesis, pueden ayudarnos a analizar de forma aislada mecanismos bioquímicos y moleculares asociados con la termorregulación.

El tejido adiposo contiene diferentes tipos celulares, entre los que se incluyen macrófagos residentes, los cuales dependiendo de las condiciones experimentales y el estado fisiológico pueden significar hasta un 40% de la

población celular en el tejido adiposo (139). En este sentido, se ha descrito que en el tejido adiposo los macrófagos pueden liberar catecolaminas, favoreciendo que en el TAM aumente la expresión de genes relacionados con la termorregulación. Por ejemplo, la estimulación con IL-4 del TAM promueve la expresión de norepinefrina por los macrófagos contenidos en el TAM (140). Por ello, no podemos descartar a través de nuestro diseño experimental, tanto en el TAM obtenido de los conejos o en el TAM para los experimentos de incubación in vitro, que la norepinefrina endógena pueda tener algún papel en los resultados obtenidos. No obstante, es muy probable que la cantidad de norepinefrina endógena producida por los macrófagos residentes en el TAM pueda ser suficiente para producir cambios en el perfil de expresión de las proteínas analizadas en nuestros experimentos. En este sentido, un estudio reciente ha sugerido que en respuesta a IL-4 los macrófagos residentes no sintetizan cantidades relevantes de catecolaminas y, por lo tanto, no tienen un papel directo en el metabolismo del adipocito o en la adaptación de la termogénesis (141).

Otro punto que hay que explicar es que la medida de la actividad lactato deshidrogenasa. La liberación de lactato deshidrogenasa se ha asociado con daño celular y pérdida de viabilidad celular. No obstante, en este estudio la actividad y medida de lactato deshidrogenasa se realizó en el tejido, y no en supernadantes de la incubación del TAM. Además, la actividad lactato deshidrogenasa estaba reducida en una situación de estrés como puede ser la reducción de temperatura a 32°C en presencia de norepinefrina. Todo esto puede descartar que la actividad lactato deshidrogenasa reflejara alteraciones en la viabilidad del tejido.

Los animales homeotermos o de sangre caliente tienen la capacidad de controlar, dentro de un estrecho margen, su temperatura corporal independientemente a la temperatura ambiente. Cuando los mamíferos y las aves evolucionaron a partir de los reptiles, no solo lo hicieron con sangre caliente y capacidad de regular la temperatura, sino que se modificaron cualidades de las células del cuerpo. El sistema general de respuesta del cuerpo animal en su defensa contra el frío contempla una doble dirección: disminuir las pérdidas de calor y aumentar la producción de este. Se disminuye la pérdida de calor mediante un cambio en la distribución del flujo sanguíneo cutáneo al producirse vasoconstricción periférica y por el aumento del aislamiento de superficie (interacción piel-pelaje). La producción de calor se incrementa por el ejercicio físico, el escalofrío, el aumento imperceptible de la tensión muscular, el incremento del metabolismo y la ingestión de alimentos. Sin embargo, uno de los

principales mecanismos de producción de calor es la producción de termogénesis no temblorosa producida por el tejido adiposo marrón (142,143).

Como hemos indicado en la introducción de esta tesis, la termogénesis no temblorosa es muy importante en el mantenimiento de la temperatura corporal en los neonatos de muchas especies de mamíferos, además de en mamíferos hibernantes. La termogénesis no temblorosa tiene un papel fundamental en la regulación de la temperatura corporal de los adultos de muchas especies con relación a la temperatura ambiental, pudiéndose modificar en función de los cambios puntuales de la temperatura exterior ambiental, y por la exposición continuada al frío. En este sentido, la termogénesis no temblorosa se originó probablemente como un mecanismo que usaban los pájaros y mamíferos desde sus ancestros en la cadena evolutiva que permite la producción de calor sin interferir en la función muscular (143). Es decir, es una fuente esencial de producción de calor endógeno que permite a los animales permanecer eutérmicos en el frío.

Por ello, es importante conocer los mecanismos metabólicos involucrados, porque además, conociendo con mayor profundidad estos mecanismos podrían utilizarse e incluso modificarse para su empleo en el cuidado veterinario de los animales. Este fue el fundamento y objetivo principal de este trabajo de tesis: intentar profundizar en el mecanismo termogénico del tejido adiposo marrón en mamíferos.

CONCLUSIONES





29. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y COMENTARIOS

1.- En conejos New Zealand sometidos a temperatura ambiente fisiológica ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) y 24 horas de ayuno, se observó que el tejido adiposo marrón, en relación al tejido adiposo blanco, tenía una expresión mayor de los transportadores mitocondriales de ácidos grasos CPT-I y CPT-II, además de presentar también una expresión mayor de la enzima acil-CoA deshidrogenasa, enzima implicada en la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria.

2.- En conejos New Zealand sometidos a temperatura ambiente fisiológica y 24 horas de ayuno, el tejido adiposo marrón, en relación al tejido adiposo blanco, tenía un contenido mayor de lactato una expresión mayor de lactato deshidrogenasa, lo que sugeriría un aumento del metabolismo anaeróbico bajo estas condiciones experimentales.

3.- En relación con la conclusión anterior, se observó también bajo estas condiciones experimentales que el tejido adiposo marrón tenía una expresión menor de piruvato deshidrogenasa, enzima implicada en la conversión de piruvato a acetil CoA, que el tejido adiposo blanco.

4.- En conejos New Zealand sometidos a temperatura ambiente fisiológica y 24 horas de ayuno, el tejido adiposo blanco, en relación al tejido adiposo marrón, demostró una expresión mayor de la isoforma citosólica del enzima malato deshidrogenasa, implicada en la lanzadera malato-aspartato.

5.- En el tejido adiposo blanco se observó, en relación al tejido adiposo marrón, una mayor expresión de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, además de existir una tendencia de mayor expresión de 1,6 bifosfato aldolasa. Estos resultados sugieren un posible favorecimiento de la vía gluconeogénica en el tejido adiposo blanco respecto al tejido adiposo marrón.

6.- La expresión de CPT-I y CPT-II fue significativamente mayor en tejido adiposo marrón expuesto 32°C incubado in vitro sin norepinefrina.

7.- La expresión de la malato deshidrogenasa mitocondrial, enzima en la que el ciclo del ácido tricarbóxico cataliza la conversión de malato en oxalacetato, se incrementó significativamente con la presencia de norepinefrina en el tejido adiposo marrón expuesto in vitro a 32°C .

8.- La exposición in vitro del tejido adiposo marrón a una reducción de

temperatura (32°C) tanto en ausencia como en presencia de norepinefrina, aumentaron los niveles de expresión proteica de UCP-1 y se redujo la expresión proteica de la cadena α de la ATP sintasa mitocondrial en comparación con el tejido adiposo marrón incubado a 37°C.

9.-Aunque tanto el TAM incubado a 32°C en presencia o ausencia de norepinefrina mostraron una reducción de la expresión de citocromo C oxidasa respecto al TAM incubado a 37°C, solamente el incubado con norepinefrina y reducción de temperatura alcanzó significación estadística respecto al TAM incubado a 37°C.

10.- En comparación con el tejido adiposo marrón incubado a 37°C, en ausencia de norepinefrina, la reducción de la temperatura aumentó el nivel de expresión de la proteína y la actividad de lactato deshidrogenasa.

11.- La presencia de norepinefrina en el tejido adiposo marrón expuesto a 32°C redujo la expresión de lactato deshidrogenasa a niveles similares a los encontrados en tejido adiposo marrón incubado a 37°C.



BIBLIOGRAFÍA





30. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Boyles JG, Seebacher F, Smit B, McKechnie AE. Adaptive thermoregulation in endotherms may alter responses to climate change. *Integr Comp Biol*. 2011;51:676-90.
- 2.- Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis, *Nature* , 2000; 404: 652-60.
- 3.- Racinais S, Oksa J. Temperature and neuromuscular function, *Scand J Medi Sci Spor* , 2010;20:1-18.
- 4.- van Marken Lichtenbelt W. Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15:547-52.
- 5.- Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporter: physiological and pathological roles. *Biophys Rev*. 2016;8:5-9.
- 6.- Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298:E141-E145.
- 7.- Muzat JP, Ransac S, Heiske M, Derin A, Rigoulet M. Mitochondrial energetic metabolism some general principles. *Int Union Biochem Mol Biol*. 2013;65:171-179.
- 8.- Efremov RG, Baredaran R, Sazanov LA. The architecture of respiratory complex I. *Nature* 2010;465:441-445.
- 9.- Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu RY, der greezen M, Tielens AGM, Martin WF. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microl Mol Biol Rev*. 2010;76:444-495.
- 10.- Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 2000;1486:1-17.
- 11.-Glatz JFC, Luiken JJFP, Bonen A. Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. *Physiol Rev* 2010;90:367–417.
- 12.-Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*. 2004;25:495-520.
- 13.- Schulz H, Kunan WH. Beta oxidation of unsaturated fatty acids: a revised pathway. *Tends Biochem Science*. 1987;12:403-406.
- 14.- Rogers GW, Nadanaciva S, Swiss R, Davakarumi AJ, Will Y. Assesment of fatty acid beta oxidation in cells and isolated mitochondria. *Current protocols* 2014;60:1-19.

- 15.- Lu M, Zhou L, Stanley WC, Cabrera ME, Saidel GM, Yu X. Role of the Malate-Aspartate Shuttle on the Metabolic Response to Myocardial Ischemia. *J Theor Biol.* 2008; 254: 466–475.
- 16.- Hanse EA, Ruan C, Kachman M, Wang D, Lowman XH, Kelekar A. Cytosolic malate dehydrogenase activity helps support glycolysis in activity proliferating cells and cancer. *Oncogene.* 2017;36:3915-3924.
- 17.- Baba N, Bracco EF, Hashim SA. Role of brown adipose tissue in thermogenesis induced by overfeeding a diet containing medium chain triglyceride. *Lipids.* 1987;22:442-444.
- 18.- Cannon B and Nedergaard JAN. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 2004;84:277–359.
- 19.- Lin CS, Klingenberg M. Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett .* 1989;113:299-303.
- 20.- Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* 2012;58:15-23.
- 21.- Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001;60:329-339.
- 22.- Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.* 2005;205:194-208.
- 23.- Kondo T, Toyoshima Y, Ishii Y, Kyuwa S. Natural Killer T Cells in Adipose Tissue Are Activated in Lean Mice- *Exp Anim.* 2013;62:319-328.
- 24.-Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81: 715-36.
- 25.- Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr.* 2000;130: 3110S-3115S.
- 26.- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obesity.* 1998;22:1145–1158.
- 27.- Xie L, O'Reilly CP, Chapes SK, Mora S. Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782:99-108.
- 28.- Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, Rohner-Jeanrenaud F, Burger D, Dayer JM, Meier CA. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes.* 2003;52:1104–1110.

- 29.- Makki A, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines and chemokines. *ISRN inflammation*. 2013;2013:1-12.
- 30.- Yvan-Charvet L, Quignard-Boulange A 2011. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int*. 2011;79:162-168.
- 31.- Kley HK, Deselaers T, Peerenboom H & Kruskemper HL 1980. Enhanced conversion of androstenedione to estrogens in obese males. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51:1128-1132.
- 32.- Lean ME. Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc*. 1989;48:243-256.
- 33.- Macher G1, Koehler M2, Rupprecht A1, Kreiter J1, Hinterdorfer P2, Pohl EE. Inhibition of mitochondrial UCP1 and UCP3 by purine nucleotides and phosphate. *Biochim Biophys Acta*. 2018 ;1860:664-672.
- 34.- Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19:1252-1263.
- 35.- Mann, A., Thompson, A., Robbins, N., Blomkalns, A. L. Localization, Identification, and Excision of Murine Adipose Depots. *J. Vis. Exp*. 2014;e52174.
- 36.- Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*. 2010;11:253-256.
- 37.- Nygaard H, Slettaløkken G, Vegge G, Hollan I, Whist JE, Strand T, Rønnestad BR, Ellefsen S. Irisin in blood increases transiently after single sessions of intense endurance exercise and heavy strength training. *PLoS One*. 2015;e0121367.
- 38.- Zhang Y, Li R, Meng Y, Li S, Donelan W, Zhao Y, Qi L, Zhang M, Wang X, Cui T, Yang LJ, Tang D. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes*. 2014;63:514-525.
- 39.- Pyzak B, Demkow U, Kucharska AM. Brown adipose tissue and browning agents: Irisin and FGF21 in the development of obesity in children and adolescents. *Adv Exp Med Biol*. 2015;866:25-34.
- 40.- Moore HPH, Silver RD, Mottillo EP, Berilohr DA, Granneman JG. Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*. 2005;280:43109-43120.
- 41.- Jordy AB, Kiens B. Regulation of exercise-induced lipid metabolism in skeletal muscle. *Exp Physiol*. 2014;99:1586-1592.

- 42.- Tagliaferro AR, Dobbin S, Curi R, Newsholme EA. Effects of diet and exercise in the in vivo rates of the tryglyceride-fatty acids cycle in adioose tissue and muscle of the rat. *Int J Obesity*. 1990;14:957-971.
- 43.- Ducharme NA, Bickel PE. Lipid deplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*. 2008;149:942-949.
- 44.- Carmen GY, Victor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal*. 2006;18:401-408.
- 45.- Shi J, Kandrov KV. Study of glucose uptake in adipose cells. *Methods Mol Biol*. 2008;456:307-315.
- 46.- Haruta T, Morris AJ, Rose DW, Nelson JG, Mueckler M, Olefsky JM. Insulin-stimulated GLUT4 translocation is mediated by a divergent intracellular signaling pathway. *J Biol Chem*. 1995;270: 27991-27994.
- 47.- Nielsen TS, Niels Jessen N, Jørgensen JOT. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol*. 2014;52:R199-R222.
- 48.- Rayner DV. The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc Nutri Soc*. 2001;60:357-364.
- 49.- lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res*. 1993;34:1057-1091.
- 50.- Lansberg L, Young JB. Fasting, feeding and regulation of the sympathetic nervous system. *N Engl J Med*. 1978;298:1295-1301.
- 51.- Jerums G, Hardy KJ, Eisman FJA. The cyclic amp response to glucagon: comparison of tissue and plasma cyclic amp levels in the rabbit. *Diabetes* 1977;26: 81-88.
- 52.- Souza SC, Muliro KV, Liscum L, Lien P, Yamamoto MT, Schaffer JE, Dallal GE, Wang X, Kraemer FB, Obin M, Greenberg AS. Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J Biol Chem*. 2002;277: 8267-8282.
- 53.- Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta – Bioenergetics*. 2001;1504:82-106.
- 54.- Rial E, Poustie A, Nicholls DG. Brown adipose tissue mitochondria: the regulation of the 32000-M uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. *FEBS Lett*. 1983;137:197–203.
- 55.- Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 2012;151:400-413.

- 56.- Shabalina G, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J. Biol. Chem.* 2004;279:38236–38248
- 57.-Marette, A. Bukowieki, LJ. Mechanisms of norepinephrine stimulation of glucose transport in isolated rat brown adipocytes. *Int. J. Obesity.* 1990; 14:857-867.
- 58.- Knight BL. The effects of glucose, free fatty acids and lipid depletion on the metabolism in vitro of brown fat from newborn rabbits. *Biochem J.* 1972;129:1175-1177.
- 59.- Guerra C, Koza RA, Walsh K, Kurtz DM, Wood PA, Kozak LP. Abnormal nonshivering thermogenesis in mice with inherited defects of fatty acid oxidation. *J. Clin. Invest.* 1998;102:1724-1731.
- 60.- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 2002;415:96–99.
- 61.- Dlaskova A, Clarke KJ, Peter RK. The role of UCP-1 in production of reactive oxygen species by mitochondria isolated from brown adipose tissue. *<Biochim Biophys Acta.* 2010;1797:1470-1476.
- 62.- Kurpad AV, Kulkarni RN, Rodriguez D, Shetty PS. Characteristics of norepinephrine stimulated thermogenesis in undernourished subjects. *J Biosci.* 1992;17:293-303.
- 63.- Horuitz BA, Herd PA, Smith RE. Effect of norepinephrine and uncoupling agents on brown adipose tissue. *Can Physiol Pharmacol.* 1968;46:887-902.
- 64.- Hardman, MJ,Hull D. Fat metabolism in brown adipose tissue in vivo. *J Physiol.* 1970;206:263–273.
- 65.- Matthias A, Kerstin Ohlson KBE, Fredriksson JM, Jacobsson A, Nedergaard J, Cannon B. Thermogenic Responses in Brown Fat Cells Are Fully UCP1-dependent. *J Biol Chem.* 2000;275:25073-25081.
- 66.- Collins S, Surwit RS, The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Prog Hom Res.* 2001;56:309-328.
- 67.- Braun K, Oeckl J, Westermeier J, Li Y, Klingespor M. Non-adrenegic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. *J exp Biol.* 2018;221:1-14.
- 68.- Fredikson JM, Thonberg H, Ohlson KBE, Nedergaard J. Analysis of inhibitin by H89 of UCP1 gene expression and thermogenesis indicates

protein kinase A mediation of $\beta 3$ -adrenergic signaling rather than $\beta 3$ -adrenoreceptor antagonism by H89. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1538:206-217.

69.- Seydoux J, Girardier L. Control of brown fat thermogenesis by the sympathetic nervous system. *Experientia*. 1977;33:1128–1130.

70.- Shimizu Y, Nikami H, Saito M. Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *J Biochem*. 1991;110: 688-692.

71.- Marette A, Bukowiecki LJ. Stimulation of glucose transport by insulin and norepinephrine in isolated rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol*. 1989;257:C714–C721.

72.- Enerback S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab*. 2010;11:248–252.

73.- Cypess AM, Doyle AN, Sass CA, Huang TL, Mowschenson PM, Rosen HN, Tseng YH, Palmer EL 3rd, Kolodny GM. Quantification of human and rodent brown adipose tissue function using ^{99m}Tc -methoxyisobutylisonitrile SPECT/CT and ^{18}F -FDG PET/CT. *J Nucl Med* 2013;54:1896-1901.

74.- Redman LM, Redman LM, de Jonge L, Fang X, Gamlin B, Recker D, Greenway FL, Smith SR, Ravussin E. Lack of an effect of a novel $\beta 3$ -adrenoceptor agonist, TAK-677, on energy metabolism in obese individuals: a double-blind, placebo-controlled randomized study. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2007;92:527–531.

75.- Cypess AM, Chenb CY, Szea C, Wangb K, Englishb J, Chana O, Holmana AR, Talb I, Palmerb MR, Kolodnyb GM, Kahn CR. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Nat Acad Science*. 2012;109:10001–10005.

76.- Wu C, Cheng W, Sun Y, Dang Y, Gong F, Zhu H, Li N, Li F, Zhu Z. Activating brown adipose tissue for weight loss and lowering of blood glucose levels: a microPET study using obese and diabetic model mice. *PLoS One*. 2014;9, e113742.

77.- Inokuma K, Ogura-Okamatsu Y, Toda C, Kimura K, Yamashita H, Saito M. Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes*. 2005;54, 1385–1391.

78.- Kozak UC, Kozak LP. Norepinephrine-dependent selection of brown adipocyte cell lines. *Endocrinology*. 1994;134:906–913.

79.- Shaughnessy S, Smith ER, Kodukula S, Storch J, Fried SK. Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2 $^{-/-}$) after short-term high-fat feeding: functional compensation

by the keratinocyte [correction of keritinocyte] fatty acid binding protein. *Diabetes*. 2000;49:904–911.

80.- Perez-Segura P, Zamorano-León JJ, Acosta D, Santos-Sancho JM, Modrego J, Caldés T, de la Hoya M, Díaz-Rubio E, Díaz-Millán I, de Las Heras N, Rico Zalba LA, Lahera V, Melander O, López Farré A. BRCA2 gene mutations and coagulation-associated biomarkers. *Thromb Haemost*. 2016;115:415-423.

81.- Melander O, Modrego J, Zamorano-León JJ, Santos-Sancho JM, Lahera V, López-Farré AJ. New circulating biomarkers for predicting cardiovascular death in healthy population. *J Cell Mol Med*. 2015;19:2489-2499.

82.- Zamorano-León JJ, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C, Martín-Fernández B, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V, Lahera V, López-Farré A. A Proteomic approach to determine changes in proteins involved in the myocardial metabolism in left ventricles of spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2010;25:347-358.

83.- Modrego J, de las Heras N, Zamorano-León JJ, Mateos-Cáceres PJ, Martín-Fernández B, Valero-Muñoz M, Lahera V, López-Farré AJ. Changes in cardiac energy metabolic pathways in overweight rats fed a high-fat diet. *Eur J Nutr*. 2013; 52: 847-856.

84.- López-Farré AJ, Zamorano-Leon JJ, Azcona L, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, González-Armengol J, Villarroel P, Moreno-Herrero R, Rodríguez-Sierra P, Segura A, Tamargo J, Macaya C. Proteomic changes related to "bewildered" circulating platelets in the acute coronary syndrome. *Proteomics*. 2011;11:3335-3348.

85.- López-Farré A, Rodríguez-Sierra P, Modrego J, Segura A, Martín-Palacios N, Saiz AM, Zamorano-León JJ, Duarte J, Serrano J, Moñux G. Effects of factor Xa on the expression of proteins in femoral arteries from type 2 diabetic patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78:1366-1377.

86.-Vishwanath VA. Fatty acid beta-oxidation disorders: A brief review. *Ann Neurosci*. 2016;23:51-55.

87.- Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial β -oxidation. *FEBS J*. 2004;271:462-469.

88.- McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997;244:1-14.

89.- Wajner M, Amarai AM. Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Biosci Rep.* 2016;36:e00281.

90.- Marette A, Bukowiecki LJ. Noradrenaline stimulates glucose transport in rat brown adipocytes by activating thermogenesis: evidence that fatty acid activation of mitochondrial respiration enhances glucose transport. *Biochem J.* 1991;277: 119-124.

91.- Hagberg CE1, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samén E, Lu L, Vanwildemeersch M. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature.* 2010;464:917-921.

92.- Bartelt A, Merkel M, Heeren J. A new powerful player in lipoprotein metabolism: boewn dipose tissue. *J Mol Med.* 2012;90:887-893.

93.- Nedergaard J, Lindberg O. Norepinephrine-stimulated fatty-acid release and oxygen consumption in isolated hamster brown-fat cells. Influence of buffers, albumin, insulin and mitochondrial inhibitors *Eur J Biochem.* 1979;95 139-145.

94.- Heldmaier G, Seidl K. Plasma free fatty acid levels during cold-induced and noradrenaline-induced nonshivering thermogenesis in the Djungarian hamster. *J Comp Physiol B.* 1985;155:679-684.

95.- Brown GK, Otero LJ, LeGris M, Brown RM. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genetics.* 1994;31:875-879.

96.- Rothwell NJ, Stock MJ. Effects of age on diet-induced thermogenesis and brown adipose tissue metabolism in the rat *Int J Obes.* 1983;7:583–589.

97.- Prusiner SB, Cannon B, Lindberg O. Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. I. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration. *Eur J Biochem.* 1968;6:15-22.

98.- Schmidt K, Katz J. Metabolism of pyruvate and L-lactate by rat adipose tissue *J Biol Chem.* 1969;44:2125-2131.

99.- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444:847-853.

100.- Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent traslocation in intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1980;255:4758-4762.

101.- Bolsani-Lopes A, Alonso-Vale MIC. Lipolysis and lipases in white adipose tissue. *Ann Update. Arch Endocrinol Metab.* 2015;59:2359-4292.

102.- Olefsky JM. Effects of fasting on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation in isolated rat adipocytes: relationships between insulin receptors and insulin action *J Clin Invest.* 1976;58:1450-1460.

103.- Musrati RA, Kollárová M, Mernik N, Mikulášová D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General Physiol Biophysics.* 1988;17:193-210.

104.- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Many shuttles allow movement across the mitochondrial membranes. En: *Biochemistry*, 5ª edición, New York. 2002.

105.- Wole RR, Peters EJ. Lipolytic response to glucose infusion in human subjects. *Am J Physiol.* 1987;252:E218-E223.

106.- Wolfe BM, Klein S, Peters EJ, Schmidt BF, Wolfe RR. Effect of elevated free fatty acids on glucose oxidation in normal humans. *Metabolism.* 1988;37:323-329.

107.- Ellis JM, Li LO, Wu PC, Koves TR, Ilkayeva O, Stevens RD, Watkins SM, Muoio DM, Coleman RA. Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab.* 2010;12:53-64.

108.- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes.* 2009;58:1526-1531.

109.- Jieun L, Ellis JM, Wolfgang MJ. Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress induced inflammation. *Cell Re.* 2015;10:266-279.

110.- Rial E, González-Barroso MM. Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1504:70-81.

111.- Winkler E, Klingenberg M. Effect of fatty acid on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem* 1994;269:2508-2515.

112.- Garlid KD, Jaburek M, Jezek P. The mechanism of protein transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett* 1998;438:10-14.

113.- Shabalina IG, Jacobson A, Cannon B, Nedergaard J. Nature UCP-1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem*. 2004;279:38236-38248.

114.- Divakaruni AJ, Humphrey DM, Brand MD. Fatty acids changes the conformation of uncoupling protein 1 (UCP1). *J Biol Chem*. 2012;287:36845-36853.

115.- Ma S, Yu H, Zhao Z, Luo Z, Chen J, Ni Y, Jin R, Ma L, Wang P, Zhu Z, Li L, Zhong J, Liu D, Nilius B, Zhu Z. Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol* 2012;4:88-96.

116.- Mahieu F, Owsianik G, Vrsbergt L, Janssens A, De Smeth H, Nilius B, Voets T. TRPM8-independent menthol-induced Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum and Golgi. *J Biol Chem*. 2007;282:3325-3336.

117.- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*. 2007;87:16-217.

118.- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Early TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*. 2007;54:371-378.

119.- Azzu V, Brand MO. The on/off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci*. 2010;35:298-307.

120.- Saito S, Saito CT, Shingai R. Adaptive evolution of the uncoupling protein 1 gene contributed to the acquisition of novel nonshivering thermogenesis in ancestral eutherian mammals. *Gene*. 2008;408:37-44.

121.- Jonck MI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inher Metab Dis*. 2012;35:211-225.

122.- Velours J, Arselin G. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*. 2000;32:383-390.

123.- Kazak L, Chouchani ET, Stavrovskaya IG, Lu GZ, Jedrychowski MP, Egan DF, Kumari M, Kong X, Erickson BK, Szpyt J, Rosen ED, Murphy MP, Kristal BS, Gygi SP, Spiegelman BM. UCP1 deficiency causes brown fat respiratory chain depletion and sensitizes mitochondria to calcium overload-induced dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:7981-7986.

- 124.- Seydoux J, Girardier L. Control of brown fat thermogenesis by the sympathetic nervous system. *Experientia*. 1977;33:1128-1130.
- 125.- Soderlund V, Larsson SA, Jacobsson H. Reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. *Eur J Nuc Med Mol Imaging*. 2007;34:1018-1022.
- 126.- Richard D, Picard F. Brown fat biology and thermogenesis. *Front Biosci*. 2011;16:1233-1260.
- 127.- Townsend KL, An D, Lynes MD, Huang TL, Zhang H, Goodyear LJ, Tseng Y. Increased mitochondrial activity in BMP7-treated brown adipocytes, due to increased CPT1- and CD36-mediated fatty acid uptake. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19:243-257.
- 128.- Kadenbach B, Ramzan R, Vogt S. Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function. *Trends Mol Med*. 2009;15:139-147.
- 129.- Vogt S, Rhiel A, Weber P, Ramzan R. Revisiting Kadenbach: Electron flux rate through cytochrome c-oxidase determines the ATP-inhibitory effect and subsequent production of ROS. *Bioassays*. 2016;38:556-567.
- 130.- Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP, Lu GZ, Erickson BK, Szpyt J, Pierce KA, Laznik-Bogoslavski D, Vetrivelan R, Clish CB, Robinson AJ, Gygi SP, Spiegelman BM (2016) Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, 532: 112-6.
- 131.- Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. Mitochondrial reactive oxygen species and adipose tissue thermogenesis.: Bridging physiology and mechanisms. *J Biol Chem*. 2017;292:16810-16816.
- 132.- Han YH, Buffalo M, Pires KM, Pei S, Scherer PE, Boudina S. Adipocyte-specific deletion of manganese superoxide dismutase protects from diet-induced obesity through increased mitochondrial uncoupling and biogenesis. *Diabetes*. 2016;65:2639-2651.
- 133.- Shimizu Y, Nikami H, Saito M. Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *J Biochem*. 1991;110: 688-692.
- 134.- Chernogubova E, Cannon B, Bengtsson T. Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. *Endocrinology*. 2004;145:269-280.
- 135.- Han DH, Nolte LA, Ju JS, Coleman T, Holloszy JO, Semenkovich CF. UCP-mediated energy depletion in skeletal muscle

increases glucose transport despite lipid accumulation and mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol*. 2004;286:E347–E353.

136.- Desautels M, Dulos RA, Mozaffari B. Selective loss of uncoupling protein from mitochondria of surgically of brown adipose tissue of cold-acclimated mice. *Biochem Cell Biol*. 1986;64:1125-1134.

137.- Festuccia WT, Blanchard PG, Richard D, Deshaies Y. Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR- activation. *Am J Physiol* 2010;299:R159-R167.

138.- Ye L, Wu J, Cohen P, Kazak L, Khandekar MJ, Jedrychowski MP, Zeng X, Gyi SP, Spiegelman BM. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc Nat Acad Science*. 2013;110:12480-12485.

139.- Neels JG, Olefsky JM. Inflammation: what starts the fire?. *J Clin Invest*. 2006;116:33-35.

140.- Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*. 2011;480:104-108.

141.- Fischer K. Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature*. 2017;23:623-630.

142.- Cannon B, Nedergaard J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol*. 2011;214:242-253.

143.- Nowack J, Giroud S, Arnold W, Ruf T. Muscle non-shivering thermogenesis and its role in the evolution of endothermy. *Front Physiol*. 2017;8:889-902.

ANEXO I







Dirección General del Medio Ambiente
CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

Comunidad de Madrid



REGISTRO DE SALIDA
Ref: 10/028223 9/15 Fecha: 17/02/2015 11:03

Cons. Medio Ambiente y Orden. Territorio
Reg. C. Medio Amb. y Ord. T. (ALC)
Destino: A/A Natalia de las Heras Jiménez - UCM -

Vista la solicitud presentada por NATALIA DE LAS HERAS JIMÉNEZ, para la autorización del proyecto de memoria técnica titulada EFECTOS DE EXTRACTOS CON ALTO CONTENIDO EN POLIFENOLES Y TRITERPENOIDES SOBRE LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y SUS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES Y METABÓLICAS ASOCIADAS: a desarrollar en el centro usuario CAI ANIMALARIO UNIVERSIDAD COMPLUTENSE con código de registro ES280790000086 y siendo el responsable del proyecto VICENTE LAHERA JULIÁ Y NATALIA DE LAS HERAS JIMÉNEZ.

Visto el informe del Área de Protección Animal.

Considerando que el citado proyecto se ajusta a lo establecido en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: autorizar la realización del proyecto referenciado siempre que se mantengan las condiciones que dieron lugar a la autorización y que el personal que intervenga tenga la preparación y formación adecuada que se especifica en el citado Real Decreto.

Tal y como se establece en el informe de evaluación aportado, este proyecto no deberá ser sometido a la realización de una evaluación retrospectiva.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Consejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio (C/ Alcalá 16, 28014 Madrid), o ante el Director General del Medio Ambiente (C/ Alcalá 16, 28014 Madrid), o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley.

Madrid, 10 de febrero de 2015.
EL DIRECTOR GENERAL DEL MEDIO AMBIENTE

Fdo.: Ricardo Riquelme y Sánchez de la Viña.

Ref PROEX 317/14



ANEXO II





Metabolic differences between white and brown fat from fasting rabbits at physiological temperature

Z López-Ibarra¹, J Modrego², M Valero-Muñoz³, P Rodríguez-Sierra², J J Zamorano-León², A González-Cantalapiedra¹, N de las Heras^{2,3}, S Ballesteros^{2,3}, V Lahera^{2,3} and A J López-Farré^{2,4}

¹Surgery Department, Hospital Universitario ROF-Codina, Lugo, Spain

²Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

Departments of ³Physiology, and ⁴Medicine, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

Correspondence should be addressed to A J López-Farré or V Lahera

Emails

ajlf@telefonica.net or vlahera@med.ucm.es

Abstract

It has been suggested that activated brown adipose tissue (BAT) shows increased glucose metabolic activity. However, less is known about metabolic activity of BAT under conditions of fasting and normal temperature. The aim of this study was to compare the possible differences in energetic metabolism between BAT and white adipose tissue (WAT) obtained from rabbits under the conditions of physiological temperature and 24 h after fasting conditions. The study was carried out on New Zealand rabbits ($n = 10$) maintained for a period of 8 weeks at $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Food was removed 24 h before BAT and WAT were obtained. Protein expression levels of the glycolytic-related protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and pyruvate dehydrogenase were higher in WAT than that in BAT. The expression level of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) and CPT2, two fatty acid mitochondrial transporters, and the fatty acid β -oxidation-related enzyme, acyl CoA dehydrogenase, was higher in BAT than in WAT. Cytosolic malate dehydrogenase expression and malate dehydrogenase activity were higher in WAT than in BAT. However, lactate dehydrogenase expression and lactate content were significantly higher in BAT than in WAT. In summary, this study for the first time, to our knowledge, has described how under fasting and normal temperature conditions rabbit BAT seems to use anaerobic metabolism to provide energetic fuel, as opposed to WAT, where the malate–aspartate shuttle and, therefore, the gluconeogenic pathway seem to be potentiated.

Key Words

- ▶ adipose tissue
- ▶ energetic metabolism
- ▶ gluconeogenesis

Journal of Molecular Endocrinology
(2015) 54, 105–113

Introduction

Adipose tissue is well recognized as an organ designed to store excessive carbon in the form of fatty acids esterified to glycerol (triglycerides). Adipose tissue is also now recognized as the organism's main contributor to crucial survival mechanisms including the maintenance of body temperature (Lean 1989). In rodents, thermogenesis is dependent upon brown adipose tissue (BAT), while white

adipose tissue (WAT) has been identified as the greatest reserve of triglycerides in the body (Dawkins & Hull 1964).

The two main metabolic processes of WAT are lipogenesis and lipolysis. In this regard, WAT accommodates caloric excess by expanding to store triglycerides and compensates for caloric deficit through the mobilization of free fatty acids. Free fatty acids derived from WAT

lipolysis are the principal source of lipid fuel in the fasting state. In addition to its role as fatty acid stock, WAT is needed for normal glucose homeostasis and is involved in other processes such as inflammation and various endocrine functions (Trayhurn & Beattie 2001).

Glucose is an essential component for adipose tissue metabolism, primarily to provide glycerol-3-phosphate to form the backbone of triacylglycerol (Athenstaedt & Daum 2006). In this regard, fasting has profound effects on *in vivo* glucose metabolism, because starvation results in low circulating insulin levels, promoting a state of glucose intolerance (Szepesi & Berdanier 1971). Moreover, increased free fatty acid availability has been associated with stimulation of gluconeogenesis, involving, in organs such as the liver, regulation of key metabolic pathways such as the aspartate–malate shuttle, although the situation in the adipose tissue requires better investigation.

Unlike WAT, BAT is a mitochondria-rich tissue and expresses uncoupling protein 1 (UCP1). Sympathetic activation of BAT activates lipase-mediated triacylglycerol hydrolysis releasing fatty acids. Lipolysis-derived fatty acids are directed to the mitochondria where UCP1 promotes mitochondrial uncoupled respiration, resulting in heat generation without ATP synthesis (Lin & Klingenberg 1980, Cannon & Nedergaard 2004). In this regard, BAT should potentially have a marked ability to oxidize fatty acids and glucose, probably toward aerobic metabolism, due to its high mitochondrial content. Indeed, it was well established that under activated thermogenesis, BAT is a plasma-lipid-and glucose-clearing organ in rodents (Festuccia *et al.* 2009, Bartelt *et al.* 2011). In this regard, feeding with concomitantly elevated plasma insulin levels seems to increase glucose uptake by BAT (Bukowiecki 1989).

However, although several works have focused on studying the energetic metabolism in BAT under cold or diet-induced thermogenesis (Rothwell & Stock 1983, Festuccia *et al.* 2009, Bartelt *et al.* 2011), less is known about BAT metabolism in the fasting state and the possible differences between WAT and BAT metabolism under conditions of fasting and physiological environmental temperature.

Therefore, this study aimed to compare the possible differences in energetic metabolism between BAT and WAT obtained from rabbits under the conditions of physiological temperature and 24 h after fasting. Specifically, this study investigated for the first time, to our knowledge, the possible differences between BAT and WAT in glucose metabolism, fatty acid β -oxidation, and the gluconeogenesis-associated aspartate–malate shuttle.

Materials and methods

Experimental animals

The study was carried out in New Zealand rabbits ($n=10$; Granja Cunicular, Navarra, Spain) weighing 2.35 ± 0.023 kg. The rabbits were maintained during 8 weeks with free access to tap water and control-fed with a standard diet (80–100 g/day; SF412 PANLAB SLU, Barcelona, Spain). Table 1 gives the composition of the diet. Rabbits were maintained under conditions of physiological temperature (23 ± 2 °C) with a standard 12 h light:12 h darkness cycle. Food was removed 24 h before BAT and WAT were obtained.

The experimental protocol and procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Universidad Complutense, according to the guidelines for ethical care of experimental animals of the European Community. The rabbits were killed with an intravenous overdose (60–65 mg/kg bw) of pentobarbitone sodium (Dolethal, Vetoquinol S.A., France) and exsanguination.

After being killed, WAT was obtained from the lumbar region. In this regard, although the different depots may have different importance in the metabolic activity of WAT, it has been reported that upper-body WAT, including that from the lumbar region, provides the major proportion of systemic nonesterified fatty acid indicating a high metabolic activity (Martin & Jensen 1991). BAT was obtained from the interscapular depot. These fat pads are anatomically well defined and whole masses can be easily dissected. Fat pads were then weighed, washed in saline solution, dried and immediately frozen, and stored at -80 °C until the molecular determinations were performed.

Circulating metabolic parameters

Blood samples were collected through a catheter inserted into the ear arteries of conscious rabbits. After 15 min of centrifugation at 1500 *g*, the serum was transferred to polypropylene tubes and frozen at -80 °C until lipids were assayed. In order to measure plasma concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides,

Table 1 Diet composition of rabbits

	Nutritional composition (%)
Proteins	12.0
Minerals ash	6.5
Moisture	10.0
Lipids	3.0
Fibers	16.0

spectrophotometric colorimetric techniques were used, according to the manufacturer's instructions (Vitros Fusion 5,1, OrthoClinical Diagnostics, Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA). LDL-cholesterol was also measured using an enzymatic colorimetric assay (SPINREACT, S.A./S.A.U., Girona, Spain).

Expression of energy-metabolism-related proteins

Protein expression levels of 1,6-biphosphate aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, cytosolic malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) and CPT2, acyl CoA dehydrogenase, and UCP1 were analyzed by western blotting. In brief, homogenized BAT and WAT were solubilized in Laemmli buffer containing 2-mercaptoethanol. The proteins obtained were separated on denaturing SDS-PAGE 15% (w/v) polyacrylamide gels. Equal amounts of proteins (20 µg/lane), estimated using bicinchoninic acid reagent (Pierce, Rockford, IL, USA), were loaded into the gels. Proteins were blotted onto nitrocellulose (Immobilion-P; Millipore, Madrid, Spain) and the blots were blocked overnight at 4 °C with 5% (w/v) nonfat dry milk as reported (previously [Modrego et al. 2013](#)). The membranes were then incubated with different antibodies against each of the aforementioned proteins. For this purpose, 1,6-biphosphate aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were determined using a polyclonal antibody and a MAB respectively (sc-12061 and sc-47724 respectively, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:1000). Lactate dehydrogenase was determined using a MAB (sc-133123, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:100). Pyruvate dehydrogenase and cytosolic malate dehydrogenase were determined by using a polyclonal antibody (sc-7140 and sc-49234, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:1000). CPT1 and CPT2 were determined using polyclonal antibodies at a dilution of 1:1000 purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-20670 and sc-20526 respectively). Acyl CoA dehydrogenase was determined by using a polyclonal antibody (ACAD-10 sc-1304 dilution 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). UCP1 was determined by using a polyclonal antibody (UCP1 sc-6529 dilution 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The same samples were also incubated with a monoclonal anti-β-actin antibody as a loading control. After incubations, nitrocellulose membranes were washed and incubated with a peroxidase-conjugated anti-goat IgG antibody (for pyruvate dehydrogenase, cytosolic malate dehydrogenase, acyl CoA dehydrogenase, CPT2, and UCP1),

a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (for CPT1), and with an anti-mouse IgG antibody (for glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, and β-actin), and developed with ECL reagents (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Chemoluminescence was evaluated by densitometry using Kodak Software (Kodak Gel Logic 2200, Imaging system densitometric Software). Prestained protein markers (Sigma) were used for molecular mass determinations.

Determination of lactate content and, aconitase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase activities

Lactate content in adipose tissues and aconitase, lactate dehydrogenase, and malate dehydrogenase activities were determined by using the commercial colorimetric assay kits (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, USA) following the manufacturer's instructions. To determine both lactate content and enzymatic activities, 80 µg of each homogenized adipose tissue was used.

Statistical analyses

Statistical differences were analyzed using the Mann-Whitney's test. Results are expressed as mean ± s.e.m. A *P* value <0.05 was considered to be statistically significant. All data were analyzed using the SPSS Software Package (SPSS for Windows; SPSS, Inc., version 15.0).

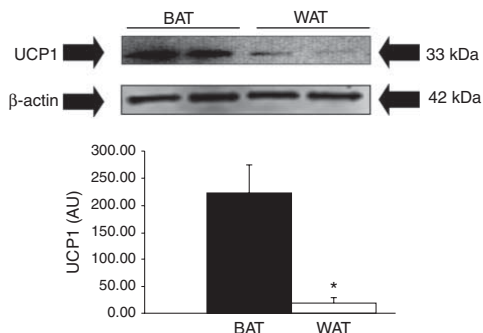
Results

Table 2 lists the circulating metabolic characteristics of the rabbits. As was previously described, UCP1 was expressed in BAT but it was almost unexpressed in WAT, confirming the purity of the tissues used (Fig. 1).

Table 2 Lipid and glycolic circulating metabolic characteristics of the rabbits. Results represent the mean ± s.e.m. of ten rabbits

Lipid metabolism	
LDL-cholesterol (mmol/l)	0.15 ± 0.04
HDL-cholesterol (mmol/l)	0.42 ± 0.02
Total cholesterol (mmol/l)	0.66 ± 0.09
Triglycerides (mmol/l)	0.82 ± 0.08
Glycolic metabolism	
Glucose (mmol/l)	5.03 ± 0.22
Insulin (mU/l)	8.73 ± 0.97
HOMA index	1.99 ± 0.25

HOMA, homeostasis model assessment.

**Figure 1**

Representative western blot showing UCP1 expression in BAT and WAT. The expression of UCP1 protein was used to assess the purity of the tissues used. β -actin was used as a loading control. At the bottom, the bar graphs show the results of densitometric analysis of all the western blots in arbitrary units (AU). The densitometric results represent the mean \pm S.E.M. of ten different rabbits. * $P < 0.05$ with respect to BAT.

Expression of proteins related to glucose and fatty acid metabolism in BAT and WAT

Protein expression levels of fructose 1,6-biphosphate aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, two glycolytic enzymes, were determined in BAT and WAT. The protein expression level of glyceraldehyde-

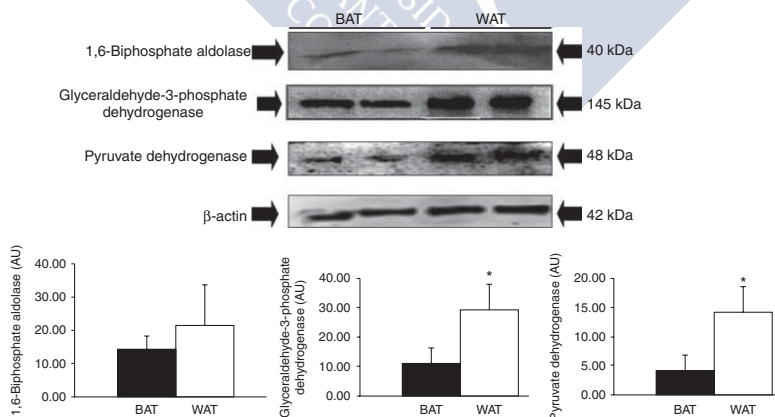
3-phosphate dehydrogenase was significantly higher in WAT than in BAT (Fig. 2). The expression level of 1,6-biphosphate aldolase also tended to be higher in WAT than in BAT, although it did not reach statistical significance (Fig. 2). Moreover, the expression level of pyruvate dehydrogenase, an enzyme that yields acetyl-CoA from pyruvate, was also significantly higher in WAT than in BAT (Fig. 2).

The protein expression level of the two fatty acid mitochondrial transporters, CPT1 and CPT2, was also determined in the both adipose tissues. BAT showed significantly higher expression levels of both CPT1 and CPT2 than WAT (Fig. 3). Moreover, the expression level of acyl CoA dehydrogenase, an enzyme involved in fatty acid β -oxidation, was also higher in BAT than in WAT (Fig. 3).

Malate dehydrogenase, aconitase, and lactate complex

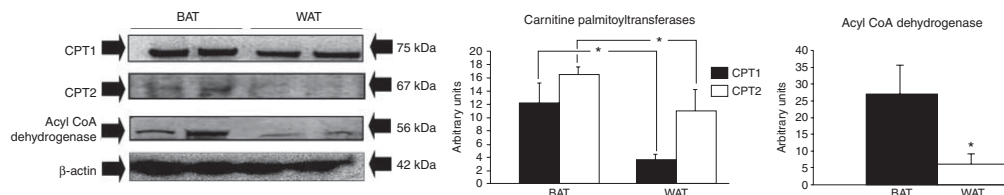
Cytosolic malate dehydrogenase expression and activity were higher in WAT than in BAT (Fig. 4). There were no significant differences in aconitase activity between the two adipose tissues (Fig. 4).

There was markedly higher expression and activity of lactate dehydrogenase in BAT in comparison with WAT (Fig. 5). However, lactate dehydrogenase activity was similar in both adipose tissues (Fig. 5).

**Figure 2**

Representative western blots showing the expression of glycolytic enzymes in BAT and WAT obtained from rabbits. At the top, representative western blots showing the expression of 1,6-biphosphate aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and pyruvate dehydrogenase in BAT and WAT. β -actin was used as a loading control. Each protein image corresponds

to different gels with respect to the other proteins shown in the figure. At the bottom, the bar graphs show the results of densitometric analysis of all the western blots in arbitrary units. The densitometric results represent mean \pm S.E.M. of ten different rabbits. * $P < 0.05$ with respect to BAT.

**Figure 3**

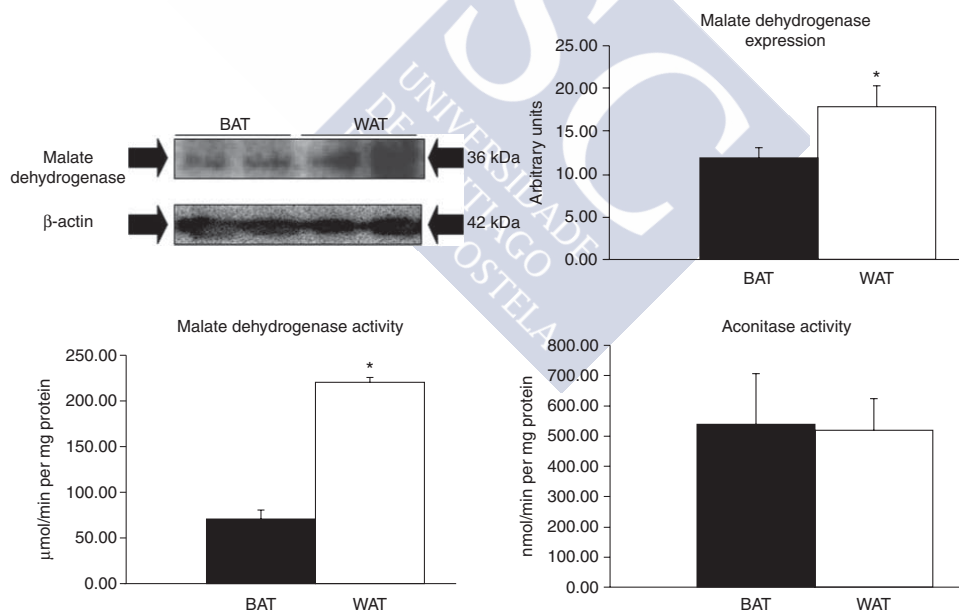
Representative western blots of the two fatty acid mitochondrial transporters, CPT1 and CPT2, and acyl CoA dehydrogenase, an enzyme involved in fatty acid β -oxidation, in BAT and WAT. At the left, a representative western blot showing the protein expression of fatty acid β -oxidation-related proteins. β -actin was used as a loading control.

Each protein image corresponds to different gels with respect to the other proteins shown in the figure. At the middle and right, the bar graphs show the results of densitometric analysis of all the western blots in arbitrary units. The densitometric results are represent the mean \pm S.E.M. of ten different rabbits. * $P < 0.05$ with respect to BAT.

Discussion

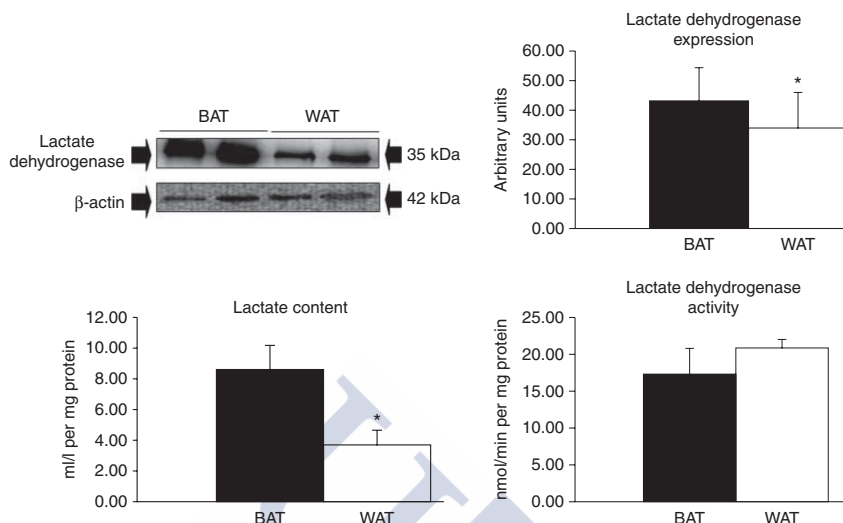
This study showed for the first time, to our knowledge, that, after 24-h fasting at physiological temperature, the expression and activities of proteins associated with gluconeogenesis are increased in WAT compared with BAT. However, BAT showed a greater expression of both of the

two main mitochondrial fatty acid transporters, CPT1 and CPT2, and also of an enzyme involved in fatty acid β -oxidation, acyl CoA dehydrogenase, than WAT. In addition, BAT showed higher lactate dehydrogenase expression and lactate content compared with WAT, indicating that under these experimental conditions the

**Figure 4**

Protein expression of cytosolic malate dehydrogenase and enzymatic activities of aconitase and malate dehydrogenase in BAT and WAT. At the top left, there is a representative western blot of cytosolic malate dehydrogenase expression in BAT and WAT. β -actin was used as a loading control. At the top right the

densitometric results of all the western blots in arbitrary units are shown. At the bottom, histograms show the enzymatic activities of aconitase and malate dehydrogenase in BAT and WAT. The results are represent the mean \pm S.E.M. of ten different rabbits. * $P < 0.05$ with respect to BAT.

**Figure 5**

Lactate dehydrogenase expression, lactate content, and lactate dehydrogenase activity in BAT and WAT. At the top left is a representative western blot of lactate dehydrogenase expression in BAT and WAT. β -actin was used as a loading control. At the top right and bottom, histograms show the

lactate content and the enzymatic activity of lactate dehydrogenase in BAT and WAT. Results represent the mean \pm S.E.M. of ten different rabbits.

* $P < 0.05$ with respect to BAT.

anaerobic metabolism seems to be favored in BAT over WAT. In this regard, the increased content of lactate in BAT with respect to WAT seems to be dependent on increased expression of lactate dehydrogenase rather than changes in lactate dehydrogenase activity. In this regard, the fact that the expression of pyruvate dehydrogenase, one of the enzymes included in the pyruvate dehydrogenase complex that acts at the end of the glycolytic pathway controlling the conversion of pyruvate into acetyl-CoA, was significantly higher in WAT than in BAT may influence the increased expression of lactate dehydrogenase in BAT with respect to that found in WAT. Indeed, dehydrogenase deficiency has previously been associated with lactic acidosis (Brown *et al.* 1994).

Fasting has profound effects on glucose metabolism, resulting in a state of glucose intolerance. Glucose is also an essential component of adipose tissue metabolism (Cushman & Wardzala 1980, Suzuki & Kono 1980). In this study, after rabbits had fasted for 24 h at physiological temperature, WAT showed higher expression of one of the main enzymes involved in glycolysis, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, than that observed in BAT. Moreover, as mentioned above, pyruvate dehydrogenase expression was also significantly higher in WAT than in BAT. Taken together, these results may initially indicate that under

the conditions of physiological temperature and fasting, WAT may have higher rate of glucose catabolism than BAT. This could be subsequent to acceleration of lipolysis, because it is well known that lipolysis could be increased in WAT during fasting. However, results from previous studies have indicated that, under fasting conditions in rodents, WAT showed a reversible reduction in insulin-stimulated glucose transporters, decreasing the glucose oxidation rates. Interestingly, it was reported that binding of insulin to adipocytes from WAT was increased by fasting (Olefsky 1976). The discrepancy between the increased binding of insulin and the biological effect of the hormone has been suggested to be related to an acquired limitation of the cellular capacity for glucose metabolic activity (Olefsky 1976). Moreover, refeeding caused an overshoot in insulin-stimulated glucose uptake by WAT (Moore 1963).

Our results apparently also indicate that in WAT obtained from fasting rabbits at physiological temperature, the tricarboxylic acid cycle may be increased as compared with BAT. In this regard, although the activity of aconitase, an enzyme involved in the tricarboxylic acid cycle, was similar between WAT and BAT, an increased activity and expression of malate dehydrogenase was observed in WAT with respect to BAT. However, malate

dehydrogenase does not only participate in citrate formation in the mitochondria through the tricarboxylic acid cycle. In the adipose tissue, there is another cytosolic malate dehydrogenase isoform that reduces oxaloacetate to malate, releasing NAD⁺. In the cytosol, malate dehydrogenase is part of the malate–aspartate shuttle involved in gluconeogenesis (Musrati *et al.* 1998). For this reason, in our experiments, a MAB that recognized the N-terminal site of the cytosolic malate dehydrogenase was used. Taken together, these results support the hypothesis that the malate–aspartate shuttle may be increased in WAT with respect to in comparison with BAT.

The question then raised is why WAT has increased cytosolic malate dehydrogenase expression and activity after a 24-h fasting period at physiological temperature. Furthermore, to transport oxaloacetate outside the mitochondria, as oxaloacetate cannot leave the mitochondria, one of the main contributions of the malate–aspartate shuttle is the regeneration of NADH inside the mitochondrial matrix. This is potentially important because most of the gluconeogenic enzymes are located in the cytoplasm. In cytosol, malate is converted by the cytoplasmic malate dehydrogenase into oxaloacetate which is then converted into phosphoenolpyruvate to participate in glucose synthesis. The use of malate in the cytoplasm has advantages because the conversion of malate into oxaloacetate produces NADH that will be further required for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase step during gluconeogenesis (Berg *et al.* 2002). Accordingly, as mentioned above, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, an enzyme involved in both glycolysis and gluconeogenesis, has been found to be increased in WAT with respect to BAT. Moreover, the protein expression level of 1,6-bisphosphate aldolase, an enzyme also involved in both glycolysis and gluconeogenesis, tended to be higher in WAT as compared with BAT, although the difference did not reach statistical significance.

Result from several studies have indicated that when glucose availability increases, fat oxidation decreases (Wolfe & Peters 1987, Wolfe *et al.* 1988). Therefore, speculating with regard to these results as a whole, 24 h after starvation gluconeogenesis may be promoted in WAT as a counterbalancing mechanism against a putative increased triglyceride metabolism thus preventing total depletion of the lipid droplet in white adipocytes.

It has been previously reported that in rodents, BAT displays very active glycolysis, especially under sympathetic activation (Shimizu *et al.* 1991, 1993, Cypess *et al.* 2013). However, this hypothesis was mainly based on the fact that glucose uptake and the expression and

translocation of specific glucose transporters were found to be increased in activated BAT (Shimizu *et al.* 1991, 1993, Cypess *et al.* 2013). In the present work, the expression levels of enzymes involved in glycolysis, i.e. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase, were significantly lower in BAT as compared with WAT, indicating a lesser glycolytic capacity of BAT than of WAT under the conditions of physiological temperature and fasting.

Intracellular control of fatty acid oxidation begins at the level of mitochondrial uptake of fatty acid by the fatty acid transporters CPT1 and CPT2. These mitochondrial fatty acid transporters transfer fatty acid from acyl CoA to long-chain acyl-carnitine, which is then transported into mitochondria (Bonnefont *et al.* 2004). Under fasting conditions and at physiological environmental temperature, expression of both CPT1 and CPT2 proteins was markedly higher in BAT than in WAT. Moreover, one of the proteins involved in long-chain fatty acid β -oxidation, acyl CoA dehydrogenase also showed significantly higher levels of expression in BAT than in WAT. Taken together, these results may indicate that, under the conditions of 24-h fasting at physiological temperature, fatty acid β -oxidation may be potentiated in BAT compared with WAT. It could be also in accordance with the observation that BAT has a higher mitochondrial content than WAT and also with the observation in rodents that fatty acids are physical activators of UCP1 (Marette & Bukowiecki 1991). Moreover, active BAT is considered to be a major consumer of lipids and free fatty acids and its contribution to plasma clearance of administered triglycerides has been previously reported (Hagberg *et al.* 2010, Bartelt *et al.* 2012). On the other hand, an increased release of free fatty acids during thermogenesis from BAT has been assumed, indicating a role in substrate supply to other tissues (Nedergaard & Lindberg 1979, Heldmaier & Seidl 1985). However, the finding that the lactate content was increased in BAT compared with WAT diminished the importance of aerobic fatty acid β -oxidation as energetic fuel for BAT activity under the conditions of fasting and normal temperature. Therefore, although under the conditions of fasting and normal temperature BAT has apparently prepared the metabolic machinery for active fatty acid oxidation, BAT uses the anaerobic metabolism better than the aerobic metabolism to produce energy. However, the fact that different proteins involved in fatty acid oxidation appeared to be increased in BAT under the conditions of normal temperature and fasting may be reflecting the fact that BAT has been prepared to quickly use this metabolic pathway when it may be required, for example, under the

conditions of cold-temperature or refeeding, through sympathetic and insulin-dependent mechanisms. Accordingly, as mentioned above, it is well established that sympathetic activation of BAT upregulates BAT fatty acid oxidation by increasing lipolysis, and by enhancing CPT activities and entry of fatty acids into the mitochondria (Nedergaard & Lindberg 1979, Rothwell & Stock 1983, Heldmaier & Seidl 1985). Accordingly, it is a classical observation that the thermogenic process in brown adipocytes can be mimicked by the addition of fatty acids (Prusiner *et al.* 1968). Therefore, the activation of lipolysis is a sufficient trigger for initiation of thermogenesis in brown adipocytes. In this regard, it is also plausible that under the conditions of normal temperature and fasting, and to maintain adequate intracellular triglyceride storage, BAT uses lactate to form new fatty acids that may be essential during BAT activation. Indeed, it has been previously reported that in BAT lactate may be converted into fatty acids in fasted-refeed rats but not in fed or fasted animals (Schmidt & Katz 1969).

In summary, this study described for the first time, to our knowledge, how that in rabbits under the conditions of physiological temperature and 24-h fasting, BAT seems to use anaerobic metabolism to provide energetic fuel, even though it has powerful fatty acid catabolic machinery. However, in WAT the malate–aspartate shuttle and therefore, the gluconeogenic pathway, seem to be potentiated under these experimental conditions. Better knowledge of the metabolic characteristics of BAT and WAT under different conditions improves the understanding of physiological processes and could be useful in the design of therapeutic interventions for metabolic disorders.

Declaration of interest

All authors have read and approved the submission of the manuscript and they have approved the final version of the manuscript. The material in the manuscript has not been published and is not being considered for publication elsewhere in whole or in part in any language. Moreover conflicts of interest are not involved.

Funding

This work was supported by Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (RETICS) RD12/0042/0040 and RD12/0042/0033, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER). J. M. is a staff member of RETICS. J. J. Z.-L. is a staff member of the Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2374). P. R.-S. is a staff member of Red Heracles (Redes Temáticas de Cooperación Red Heracles (RETICS) RD06/0009/010).

Acknowledgements

The authors thank Begoña Larrea for secretarial assistance.

References

- Athenstaedt K & Daum G 2006 The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63** 1355–1369. (doi:10.1007/s00018-006-6016-8)
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Irttrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C *et al.* 2011 Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine* **17** 200–205. (doi:10.1038/nm.2297)
- Bartelt A, Merkel M & Heeren J 2012 A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue. *Journal of Molecular Medicine* **90** 887–893. (doi:10.1007/s00109-012-0858-3)
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L 2002 18.5.1 Many shuttles allow movement across the mitochondrial membranes. In *Biochemistry*, 5th edn. New York, NY, USA: W H Freeman.
- Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A & Bastin J 2004 Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular Aspects of Medicine* **25** 495–520. (doi:10.1016/j.mam.2004.06.004)
- Brown GK, Otero LJ, LeGris M & Brown RM 1994 Pyruvate dehydrogenase deficiency. *Journal of Medical Genetics* **31** 875–879. (doi:10.1136/jmg.31.11.875)
- Bukowiecki LJ 1989 Energy balance and diabetes: the effects of cold exposure, exercise training, and diet composition on glucose tolerance and glucose metabolism in rat peripheral tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **67** 382–393. (doi:10.1139/y89-062)
- Cannon B & Nedergaard J 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews* **84** 277–359. (doi:10.1152/physrev.00015.2003)
- Cushman SW & Wardzala LJ 1980 Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **255** 4758–4762.
- Cypess AM, Doyle AN, Sass CA, Huang TL, Mowschenson PM, Rosen HN, Tseng YH, Palmer EL III & Kolodny GM 2013 Quantification of human and rodent brown adipose tissue function using ^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile SPECT/CT and ¹⁸F-FDG PET/CT. *Journal of Nuclear Medicine* **54** 1896–1901. (doi:10.2967/jnumed.113.121012)
- Dawkins MJ & Hull D 1964 Brown adipose tissue and the response of new-born rabbits to cold. *Journal of Physiology* **172** 2–38. (doi:10.1113/jphysiol.1964.sp007414)
- Festuccia WT, Blanchard PG, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, Richard D & Deshaies Y 2009 The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **296** R1327–R1351. (doi:10.1152/ajpregu.91012.2008)
- Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samen E, Lu L, Vanwildemeersch M *et al.* 2010 Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* **464** 917–921. (doi:10.1038/nature08945)
- Heldmaier G & Seidl K 1985 Plasma free fatty acid levels during cold-induced and noradrenaline-induced nonshivering thermogenesis in the Djungarian hamster. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **155** 679–684. (doi:10.1007/BF00694581)
- Lean ME 1989 Brown adipose tissue in humans. *Proceedings of the Nutrition Society* **48** 243–256. (doi:10.1079/PNS19890036)
- Lin CS & Klingenberg M 1980 Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Letters* **113** 299–303. (doi:10.1016/0014-5793(80)80613-2)
- Marette A & Bukowiecki LJ 1991 Noradrenaline stimulates glucose transport in rat brown adipocytes by activating thermogenesis: evidence that fatty acid activation of mitochondrial respiration enhances glucose transport. *Biochemical Journal* **277** 119–124.

- Martin ML & Jensen MD 1991 Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* **88** 609–613. (doi:10.1172/JCI115345)
- Modrego J, de las Heras N, Zamorano-León JJ, Mateos-Cáceres PJ, Martín-Fernández B, Valero-Muñoz M, Lahera V & López-Farré AJ 2013 Changes in cardiac energy metabolic pathways in overweight rats fed a high-fat diet. *European Journal of Nutrition* **52** 847–856. (doi:10.1007/s00394-012-0392-7)
- Moore RO 1963 Influence of fasting and refeeding on response of adipose tissue to insulin. *American Journal of Physiology* **205** 222–224.
- Musrati RA, Kollárová M, Mernik N & Mikulášová D 1998 Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General Physiology and Biophysics* **17** 193–210.
- Nedergaard J & Lindberg O 1979 Norepinephrine-stimulated fatty-acid release and oxygen consumption in isolated hamster brown-fat cells. Influence of buffers, albumin, insulin and mitochondrial inhibitors. *European Journal of Biochemistry* **95** 139–145. (doi:10.1111/j.1432-1033.1979.tb12948.x)
- Olefsky JM 1976 Effects of fasting on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation in isolated rat adipocytes: relationships between insulin receptors and insulin action. *Journal of Clinical Investigation* **58** 1450–1460. (doi:10.1172/JCI108601)
- Prusiner SB, Cannon B & Lindberg O 1968 Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. I. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration. *European Journal of Biochemistry* **6** 15–22. (doi:10.1111/j.1432-1033.1968.tb00413.x)
- Rothwell NJ & Stock MJ 1983 Effects of age on diet-induced thermogenesis and brown adipose tissue metabolism in the rat. *International Journal of Obesity* **7** 583–589.
- Schmidt K & Katz J 1969 Metabolism of pyruvate and l-lactate by rat adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* **244** 2125–2131.
- Shimizu Y, Nikami H & Saito M 1991 Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *Journal of Biochemistry* **110** 688–692.
- Shimizu Y, Nikami H, Tsukazaki K, Machado UF, Yano H, Seino Y & Saito M 1993 Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. *American Journal of Physiology* **264** E890–E895.
- Suzuki K & Kono T 1980 Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *PNAS* **77** 2542–2545. (doi:10.1073/pnas.77.5.2542)
- Szepesi B & Berdanier CD 1971 Time course of the starve-refeed response in rats; possible role of insulin. *Journal of Nutrition* **101** 1563–1574.
- Trayhurn P & Beattie JH 2001 Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society* **60** 329–339. (doi:10.1079/PNS200194)
- Wolfe RR & Peters EJ 1987 Lipolytic response to glucose infusion in human subjects. *American Journal of Physiology* **252** E218–E223.
- Wolfe BM, Klein S, Peters EJ, Schmidt BF & Wolfe RR 1988 Effect of elevated free fatty acids on glucose oxidation in normal humans. *Metabolism* **37** 323–329. (doi:10.1016/0026-0495(88)90131-X)

Received in final form 22 December 2014

Accepted 7 January 2015



ORIGINAL ARTICLE



Really does temperature reduction and norepinephrine have similar effects on the energy metabolism in rat brown adipose tissue?

B. Sopena^{a*}, Z. López-Ibarra^{a,b*}, A. J. López-Farré^a, N. de las Heras^c, S. Ballesteros^c, A. González-Cantalapiedra^b, V. Lahera^c and J. J. Zamorano-León^a

^aDepartment of Medicine, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ^bSurgery Department, Hospital Universitario ROF-Codina, Lugo, Spain; ^cDepartment of Physiology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ABSTRACT

Context: Heat generation by brown adipose tissue (BAT) in response to temperature reduction seems to be entirely related to sympathetic nervous stimulation.

Objective: To analyse if temperature reduction and norepinephrine may differently affect the expression of proteins related to energy metabolism in BAT.

Materials and methods: Isolated rats BAT was incubated with/without norepinephrine (10^{-6} mol/L, 24 h at 32 °C and 37 °C).

Results: In BAT, 32 °C increased the protein expression levels of carnitine palmitoyltransferase-I and -II, mitochondrial uncoupling protein-1 (UCP-1) and the expression and activity of lactate dehydrogenase. Mitochondrial F₁-ATP synthase α -chain expression was decreased at 32 °C compared to 37 °C. Norepinephrine and at 32 °C exposure, UCP-1 expression was increased but cytochrome-c oxidase and F₁-ATP synthase α -chain expression was reduced with respect to 37 °C.

Discussion: Sympathetic stimulation seems not to be the only factor associated with heat generation.

Conclusions: Temperature reduction by itself exerts some different effects on the expression of proteins related to the energy metabolism than norepinephrine.

ARTICLE HISTORY

Received 5 June 2017
Revised 19 July 2017
Accepted 24 July 2017
Published online 25 August 2017

KEYWORDS

Brown adipose tissue;
 β -oxidation; mitochondrial
oxidative phosphorylation;
norepinephrine; temperature
reduction

Introduction

The brown adipose tissue (BAT) is involved in thermoregulatory processes including non-shivering thermogenesis, diet-induced thermogenesis, and febrile responses (Rothwell and Stock 1979, Cannon *et al.* 1998, Sell *et al.* 2004, Nakamura *et al.* 2005). BAT possess large numbers of mitochondria containing a protein called uncoupling protein-1 (UCP-1) that dissipates the proton gradient across the inner mitochondrial membrane, thus leading heat production at the expense of ATP synthesis. In this regard, specifically complex I, II, and IV of mitochondrial oxidative phosphorylation chain pump protons into the space enclosed by the inner and outer mitochondrial membranes and then protons flow into the mitochondrial matrix through ATP synthase to form ATP. Although under cold conditions, several works have been focused on analysing changes in the activity and expression of UCP-1 in BAT, in our knowledge minor attention has been devoted to determine whether cold may also affect the level of expression of other mitochondrial respiratory chain-related enzymes than UCP-1 (Watanabe *et al.* 2008).

It was established that fatty acids hydrolysed from intracellular triacylglycerol stored in BAT are the main activators of UCP-1 and, therefore, of the mitochondrial uncoupling of oxidative phosphorylation (Zimmermann *et al.* 2004, Townsend and Tseng 2014). Indeed, it could be probably

considering the uncoupling metabolism of fatty acids as the main identified mechanism modulating maximal heat production in BAT (Prusiner *et al.* 1968, Hittelman 1969, Bukowiecki *et al.* 1981). In this regard, BAT is a tissue that seems specially prepared for long chain fatty acid β -oxidation. Indeed, we have recently reported that BAT from rabbits maintained under physiological temperature and 24-h fasting conditions, showed higher expression of carnitine palmitoyltransferase (CPT)-I and CPT-II, two fatty acid mitochondrial transporters, and the fatty acid β -oxidation-related enzyme, acyl CoA dehydrogenase than white adipose tissue (López-Ibarra *et al.* 2015).

BAT is highly innervated by the sympathetic nervous system. Activation of β_3 -adrenergic receptors by norepinephrine in BAT was associated with lipolysis and heat generation. Accordingly, norepinephrine infusion to rabbits was associated with increased oxygen consumption in BAT. This effect that was accompanied by higher circulating levels of free-fatty acids and glycerol, together with rapid and sustained heat production (Hardman and Hull 1970, Seydoux and Girardier 1977). This and other similar observations have supported that the metabolic response to temperature reduction in BAT was fully mediated by norepinephrine. However, it could not be entirely accurate.

Experimental studies have suggested that an increased metabolic BAT activity reduced body weight and it was

CONTACT José Javier Zamorano-León  aintec2@ucm.es  School of Medicine, Universidad Complutense, Avda. Ramon y Cajal sn, Madrid 28040, Spain

*These authors have contributed equally to the manuscript.

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

attributed to norepinephrine stimulation. However, other studies have reported inefficiency of β_3 -adrenergic receptor agonists, even at high doses, to induce weight loss and thermogenesis (Redman *et al.* 2007, Cypess *et al.* 2012, Wu *et al.* 2014). Moreover, in UCP-1-knockout mice, the stimulatory effect of norepinephrine on glucose utilisation, another metabolic way to generate heat by BAT, disappeared completely. This observation suggests that the increased glucose utilisation by BAT after cold stimulation is dependent on UCP-1 better than on norepinephrine alone (Inokuma *et al.* 2005). Taken together, these data open the question about if all the energetic metabolic effects derived from temperature reduction in BAT are really dependent of adrenergic stimulation of BAT. Therefore, the present work was designed to *in vitro* analyse if the presence and the absence of norepinephrine during temperature reduction in rat BAT similarly affect the expression level of proteins related to long-chain fatty acids β -oxidation and mitochondrial oxidative phosphorylation, including UCP-1.

Materials and methods

Experiments were carried out in BAT samples from male Wistar rats (214 ± 10 g) of four months age. All procedures performed in the rats were in accordance with ethical standards of the institution. Indeed, the study forms part of a large study to analyse the effect of polyphenols in rat BAT that was approved by the Animal care and Use Committee of Complutense University (Code number ES280790000086). Rats were euthanised with intravenous overdose of pentobarbitone sodium (100 mg/kg bw) and exsanguinated. After being sacrificed, BAT pad was obtained from interscapular depot. Isolated BAT pads were washed in saline solution and then maintained in a modified Krebs–Henseleit solution containing: glucose 5.5 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, NaCl 135 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgSO_4 1.2 mmol/L, CaCl_2 2 mmol/L, NaHCO_3 25 mmol/L, 0.25% albumin, 2×10^{-5} U/L penicillin, and 2×10^{-5} $\mu\text{g/L}$ streptomycin at pH 7.4. BAT portions from each rat were incubated for 24 h in a cell-cultured incubator under atmosphere of 95% O_2 /5% CO_2 either at 37 °C or 32 °C in the absence or presence of 10^{-6} mol/L norepinephrine. This norepinephrine concentration have been previously used in isolated fatty cells and even to establish cell lines with high UCP expression, mitochondrial content, and adipogenesis (Kozak and Kozak 1994, Shaughnessy *et al.* 2000). All procedures were performed in six different experiments under sterile conditions. At the end of the incubation period, BAT samples were immediately frozen at -80°C until molecular parameters were determined.

Expression of energy metabolism-related enzymes

Protein expression of mitochondrial malate dehydrogenase, CPT-I, CPT-II, mitochondrial malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, cytochrome C oxidase, mitochondrial F_1 ATP synthase α -chain, and UCP-1 was analysed by Western blot. As we have previously reported, the different BAT portions were homogenised with an Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke;

GmbH & Co, Staufen, Germany) in a buffer containing HEPES (50 mM), NaCl_2 (150 mM), glycerol (10%), Triton-X-100 (1%), and a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The homogenised BAT samples were then centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min and the supernatant stored at -80°C until analysis. Protein quantifications were done with bicinchoninic acid reagent (Pierce, Rockford, IL).

As previously we have reported (Modrego *et al.* 2012, López-Ibarra *et al.* 2015), proteins were separated on denaturing SDS-PAGE 15% (w/v) polyacrylamide gels by loading 20 $\mu\text{g/lane}$ protein solubilised in Laemmli buffer containing 2-mercaptoethanol. After electrophoresis, proteins were blotted onto nitrocellulose membranes (Immobilion-P; Millipore, Billerica, MA), and then blocked overnight at 4 °C with 5% (w/v) albumin. Nitrocellulose membranes were then incubated with different antibodies against each of the aforementioned proteins. Indeed, CPT-I and CPT-II were determined using polyclonal antibodies (sc-20670 and sc-20526, respectively, dilution 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Mitochondrial malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase were determined using monoclonal antibodies (sc-1666879 and sc-133123, dilution 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). UCP-1 was determined using a polyclonal antibody (ab23841 dilution 1:1000, Abcam, Cambridge, UK). The core subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (MT-ND1), cytochrome c oxidase and mitochondrial F_1 ATP synthase α -chain were determined using monoclonal antibodies (ab181848, Abcam, Cambridge, UK; sc-58613, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA; ab14705 Abcam, Cambridge, UK, respectively; dilution 1:1000). Nitrocellulose was also incubated with a monoclonal anti- β -actin antibody (A-5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, dilution 1:1500) used as loading control.

After incubation, nitrocellulose membranes were washed twice and incubated with a peroxidase-conjugated anti-goat IgG antibody (for CPT-II), a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (for CPT-I, mitochondrial malate dehydrogenase, MT-ND1, and UCP1) and with an anti-mouse IgG antibody (for lactate dehydrogenase, cytochrome c oxidase, mitochondrial F_1 ATP synthase α -chain and β -actin). After washed twice, nitrocellulose membranes were incubated with enhancing chemo-luminescence reagents (ECL; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Chemo-luminescence was quantified by densitometry (Kodak Gel Logic 2200, Imaging System Densitometry Software, Kingsport, TN). Pre-stained protein markers (Sigma, St. Louis, MO) were used for molecular mass determinations.

Determination of lactate dehydrogenase activity

As previously we have reported (Modrego *et al.* 2012), lactate dehydrogenase activity was determined in the BAT samples (100 μg protein each sample) using a commercial kit (K-726-500; BioVision Research Products, Mountain View, CA) based on a colorimetric assay where lactate dehydrogenase reduces NAD to NADH, which then interacts with a probe to

Table 1. Effect in rat BAT of temperature reduction in the presence and absence of 10^{-6} mol/L norepinephrine (NOR) on the expression level of proteins associated with energetic metabolism.

Variable	Incubation at 37 °C –NOR	Incubation at 32 °C	
		–NOR	+NOR
CPT-I	23.78 ± 2.45	49.66 ± 6.51*	17.55 ± 3.64†
CPT-II	10.44 ± 2.80	31.83 ± 5.99*	14.75 ± 3.96†
Mitochondrial malate dehydrogenase	21.25 ± 3.65	27.30 ± 8.23	73.29 ± 9.20*†
Lactate dehydrogenase	25.41 ± 3.69	43.23 ± 6.43*	23.12 ± 2.75†

CPT: carnitine palmitoyltransferase; NOR: norepinephrine.
Data are expressed in densitometry arbitrary units as mean ± SEM of six different experiments.
* $p < .05$ with respect to 37 °C-incubated BAT.
† $p < .05$ with respect to 32 °C-incubated BAT in the absence of norepinephrine.

produce a colour. The assay was performed following the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Unless was specified in the text; the expression of each protein was performed in six different BAT samples from six different rats that *in vitro* were incubated under the different experimental conditions. Statistical differences were analysed using Wilcoxon's test. A p value $< .05$ was considered statistically significant. All data were analysed using SPSS software package (SPSS for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL; version 15.0).

Results

Effects of temperature reduction (32 °C) in BAT

As compared with 37 °C-incubated BAT, 32 °C-exposed BAT showed a significant higher protein expression level of the two fatty acid mitochondrial transporters, CPT-I and CPT-II (Table 1 and Figure 1). The protein expression level of mitochondrial malate dehydrogenase did not reach statistical significance with respect to 37 °C-incubated BAT (Table 1).

The expression level of lactate dehydrogenase was significantly higher in 32 °C-exposed BAT as compared with that in 37 °C-exposed BAT (Table 1 and Figure 1). It was accompanied with higher lactate dehydrogenase activity in 32 °C-exposed BAT than in those exposed at 37 °C (Figure 2).

Possible changes in the level of expression of proteins associated with mitochondrial respiratory chain were also analysed. As compared with 37 °C-incubated BAT, 32 °C-incubated BAT showed significant higher UCP-1 expression and reduced expression of mitochondrial F1 ATP synthase α -chain (Table 2 and Figure 3). The expression level of cytochrome c oxidase and the core subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (complex I, MT-ND1) was similar between 32 °C and 37 °C-incubated BAT (Table 2).

Effect of norepinephrine on 32 °C-incubated BAT

The expression levels of CPT-I and CPT-II were not significantly different between 37 °C-incubated BAT and 32 °C-exposed BAT that was incubated with norepinephrine (10^{-6} mol/L) (Table 1 and Figure 1). The expression level of lactate dehydrogenase was also similar between

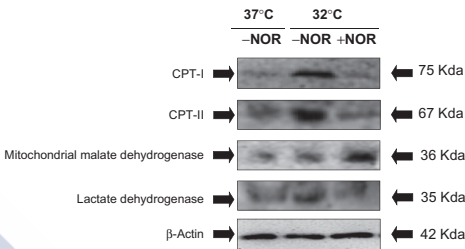


Figure 1. Representative bands of Western blots determining the expression level of proteins involved in free fatty acid transport into the mitochondria, mitochondrial malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. The bands are only representative of the expression mean obtained with all samples of each experimental group. β -Actin expression was used as loading control. CPT: carnitine palmitoyltransferase; NOR: norepinephrine.

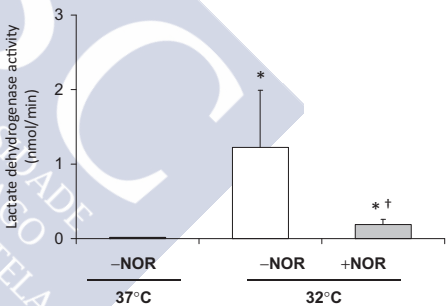


Figure 2. Enzymatic activity of lactate dehydrogenase. Results are represented as mean ± SEM. * $p < .05$ with respect to 37 °C-incubated BAT. † $p < .05$ with respect to 32 °C-incubated BAT in the absence of norepinephrine. NOR: norepinephrine.

norepinephrine-32 °C-exposed BAT and 37 °C-exposed BAT (Table 1 and Figure 1). However, lactate dehydrogenase activity was slightly higher in 32 °C-exposed BAT with norepinephrine than in 37 °C-incubated BAT (Figure 2).

Addition of norepinephrine to 32 °C-exposed BAT markedly increased mitochondrial malate dehydrogenase with respect to that observed at 37 °C-exposed BAT (Table 1 and Figure 1).

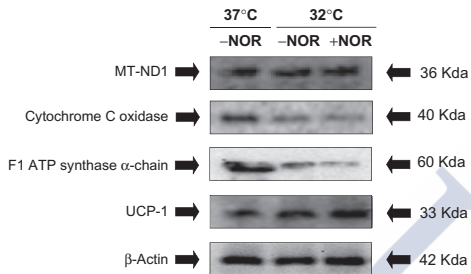
Comparing with the experiments performed at 37 °C, the samples of BAT exposed to 32 °C and 10^{-6} mol/L norepinephrine increased the protein expression level of UCP-1 and reduced the expression level of mitochondrial F1 ATP

Table 2. Effect in rat BAT of temperature reduction in the presence and absence of 10^{-6} mol/L norepinephrine (NOR) on the expression level of proteins involved in mitochondrial respiratory chain.

Variable	Incubation at 37 °C –NOR	Incubation at 32 °C	
		–NOR	+NOR
MT-ND1	11.35 ± 2.23	10.58 ± 2.14	9.86 ± 2.64
Cyt C oxidase	21.19 ± 4.18	15.82 ± 6.27	12.02 ± 2.56*
Mitochondrial F ₁ ATP synthase α -chain	53.59 ± 7.64	25.66 ± 4.63*	22.66 ± 6.21*
UCP-1	241.19 ± 98.08	352.84 ± 129.58*	421.62 ± 137.90*

UCP: uncoupling protein; MT-ND: mitochondrial-NADH dehydrogenase.

Data are expressed in densitometry arbitrary units as mean ± SEM of six different experiments.

* $p < .05$ with respect to 37 °C-incubated BAT.**Figure 3.** Representative bands of Western blots determining the expression level of proteins involved in mitochondrial respiratory chain. The bands are only representative of the expression mean obtained with all samples of each experimental group. β -Actin expression was used as loading control. UCP-1: mitochondrial-uncoupling protein-1; NOR: norepinephrine.

synthase α -chain (Table 2 and Figure 3). The expression of the cytochrome c oxidase protein was reduced in 32 °C-exposed BAT incubated with 10^{-6} mol/L norepinephrine with respect to that found in BAT exposed to 37 °C (Table 2 and Figure 3). The expression level of MT-ND1 was not changed in 32 °C-exposed BAT incubated with norepinephrine as compared with those exposed at 37 °C (Table 2).

Comparison between experiments performed at 32 °C in the presence and absence of norepinephrine

As Table 1 and Figure 1 show, CPT-I and CPT-II expression levels were significantly higher in 32 °C-incubated BAT without norepinephrine than in 32 °C-exposed BAT with norepinephrine (Table 1 and Figure 1).

Lactate dehydrogenase expression and activity were significantly higher in 32 °C-exposed BAT than in 32 °C-exposed BAT incubated with norepinephrine (Table 1 and Figures 1 and 2). However, the expression level of mitochondrial malate dehydrogenase in 32 °C-exposed BAT incubated with norepinephrine was significantly higher than that in 32 °C-incubated BAT without norepinephrine (Table 1 and Figure 1).

The expression levels of UCP-1 and mitochondrial F1 ATP synthase α -chain were similar between the two experimental groups (Table 2). Moreover, MT-ND1 expression level was also similar between 32 °C-exposed BAT incubated with and without norepinephrine (Table 2). The expression level of cytochrome c oxidase was similar in 32 °C-exposed BAT incubated in the presence and absence of norepinephrine (Table 2 and Figure 3).

Discussion

Several works have previously suggested that the metabolic changes produced on BAT by low temperature exposition are mediated by norepinephrine. In our knowledge, the present descriptive *in vitro* study suggests for the first time that independently of norepinephrine, temperature reduction by itself also promotes changes in the expression levels of energetic metabolism-related enzymes. On the other hand, in BAT exposed to temperature reduction norepinephrine also induced changes on the expression of energetic metabolism-related enzymes that in some cases were different than those elicited by temperature reduction alone.

Effects of temperature reduction on the expression of energy metabolism-related enzymes in BAT

Temperature reduction in BAT increased the expression level of the mitochondrial fatty acids transports, CPT-I and CPT-II, two obligatory steps for mitochondrial long chain fatty acid oxidation. It is well recognised that BAT contains high mitochondria number and requires fatty acid oxidation as fuel for heat generation (Ellis *et al.* 2010). Indeed, previous studies have demonstrated that cold exposure of BAT causes plasma non-esterified fatty acid uptake and lipolysis, thereby increasing the supply of fatty acids for oxidation (Saito *et al.* 2009). The importance that mitochondrial fatty acid transporters and fatty acids oxidation have for stimulating heat production promotes by temperature reduction in BAT is also supported by the fact that mice unexpressing CPT-II were not able to generate heat and/or oxidise fatty acids in BAT (Jieun *et al.* 2015).

Free fatty acids were shown as the main stimulators of UCP-1 to promote thermogenesis (Rial and González-Barroso 2001). Indeed, defective thermogenesis was demonstrated in mice lacking lipolytic adipose triglyceride lipase (Zimmermann *et al.* 2004). In this regard, the observed increased expression of CPT-I and CPT-II by incubating BAT at 32 °C may suggest an increased free fatty acids transport into the mitochondria that it could also be associated with the observed enhanced expression of UCP-1 protein.

The present experimental design does not allow us to determine the mechanisms by which, independently to norepinephrine, temperature reduction could increase UCP-1 expression in BAT. Indeed, as above-mentioned, it is probably may be related to an increased fatty acid transport and oxidation in the mitochondria. However, we could not rule out

that other mechanisms may be involved in the non-dependent norepinephrine up-expression of UCP-1 after temperature reduction. In this regard, Ma et al demonstrated in mice that, regardless of norepinephrine stimulation, UCP-1 was up-expressed in BAT through a specific cold-sensing transient receptor potential melastatin-8 (Ma et al. 2012). Further studies are then needed to analyse this and other possible mechanisms.

As above-mentioned, it is well established that active UCP-1 dissipates the proton gradient across the inner mitochondrial membrane, thus leading to heat production at the expense of reducing ATP formation. However, in our knowledge, less is known if in BAT temperature reduction may modify the protein expression level of other proteins involved in mitochondrial respiratory chain. An interesting observation derived from our results was that in addition to increase UCP-1 expression, exposure of BAT to lower temperature significantly reduced mitochondrial F1 ATP synthase α -chain protein expression. This probably takes place to further promote proton leakage to UCP-1, thus producing heat better than using protons to generate ATP by the ATP synthase.

Effects of the combination of norepinephrine and temperature reduction

Previous studies have reported that the stimulatory effects of cold exposure on BAT were mimicked by electrical stimulation of sympathetic nerves into BAT (Vallerand et al. 1990, Saito et al. 2009). However, the present *in vitro* study suggests that temperature reduction in BAT has some different effects in the presence and absence of norepinephrine on the expression levels of proteins related to energetic metabolism. In this regard, the main differences observed between temperature reduction in the presence and absence of norepinephrine were:

(1) CPT-I and CPT-II expression was significantly higher in 32°C-exposed BAT incubated without norepinephrine; (2) as compared with 37°C and 32°C-exposed BAT, mitochondrial malate dehydrogenase, enzyme in the tricarboxylic acid cycle catalyses the conversion of malate into oxaloacetate, was significantly increased by norepinephrine in 32°C-exposed BAT; (3) in the presence and absence of norepinephrine, the protein expression level of UCP-1 was increased and the expression of mitochondrial F1 ATP synthase α -chain reduced with respect to 37°C-incubated BAT. Moreover, the presence of norepinephrine also reduced cytochrome c oxidase expression in 32°C-exposed BAT; (4) as compared with 37°C-incubated BAT, in the absence of norepinephrine temperature reduction increased the protein expression level and activity of lactate dehydrogenase, but the presence of norepinephrine in 32°C-exposed BAT reduced lactate dehydrogenase expression to similar levels than those found in 37°C-incubated BAT. However, norepinephrine maintained very slightly an increased lactate dehydrogenase activity in 32°C with respect to 37°C-incubated BAT but significantly reduced it with respect to 32°C-incubated BAT.

CPT-I is located on the outer mitochondrial membrane, and is the first and rate-limiting step of the entry of free fatty

acids into mitochondria, followed by free fatty acids transport by CPT-II across the inner mitochondrial membrane. The observation that norepinephrine incubation of 32°C-exposed BAT reduced CPT-I and CPT-II expression as compared with temperature reduction alone seems to be initially paradoxical. It is because several works have reported that adrenergic activation was associated with increased mitochondrial β -oxidation (Richard and Picard 2011). However, most of these conclusions were obtained from experimental *in vivo* studies where it is not possible to dissociate the effects of cold exposure of BAT from norepinephrine stimulation. In addition, in *in vivo* studies other factors could be influencing the results. However, reports have also supported the importance of an increased expression of CPT-I to increase mitochondrial activity to produce heat by BAT (Townsend et al. 2013). Taken together, it could be speculated that during temperature reduction norepinephrine may be, in some way, modulating long fatty acid uptake by the mitochondria even reducing it. To understand this speculation, it is first important to analyse the results obtained on the mitochondrial respiratory chain.

The presence of norepinephrine during temperature reduction in BAT maintained UCP-1 up-expression and mitochondrial F1 ATP synthase α -chain down-expression observed by reducing temperature alone. In addition, the presence of norepinephrine during exposition of BAT to reducing temperature also diminished the protein expression level of cytochrome c oxidase with respect to 37°C-incubated BAT. Under normal physiological conditions, cytochrome c oxidase acts as rate-limiting step of respiratory chain. In this regard, Kadenbach's hypothesis states that the regulation of the membrane potential and ROS formation in mitochondria are determined by the ATP-induced allosteric inhibition of cytochrome c oxidase and represents a mechanism for respiratory control (Kadenbach et al. 2009). Under maximal stress conditions, as it may occur in BAT by the presence of norepinephrine during temperature reduction, cytochrome c oxidase loses its allosteric inhibition by ATP and cytochrome c oxidase activity remained increased. In addition, under these conditions the mitochondrial membrane potential was also increased favouring mitochondrial ROS formation (Vogt et al. 2016). Therefore, in BAT exposed to temperature reduction, the down expression of cytochrome c oxidase by norepinephrine may act as protective mechanism to reduce mitochondrial ROS generation through the mitochondrial respiratory chain. In this regard, activated thermogenesis in BAT was demonstrated to increase mitochondrial ROS production levels (Chouchani et al. 2016).

The fact that the expression of mitochondrial malate dehydrogenase was increased in norepinephrine-stimulated 32°C-exposed BAT as compared with BAT exposed to temperature reduction without norepinephrine may be reflexing that at maximal stress conditions, i.e. temperature reduction + norepinephrine, the tricarboxylic cycle may be trying to maintain an increased continuous proton supply for UCP-1 to produce heat; even more when cytochrome c oxidase was down-regulated by norepinephrine.

In addition to free fatty acids, glucose is another important source for producing heat in cold-exposed BAT. Glucose

utilisation in BAT was markedly enhanced after β -adrenergic agonist administration (Shimizu *et al.* 1991, Chernogubova *et al.* 2004). Studies have also supported that β -adrenergic agonists stimulation of glucose utilisation by BAT was dependent of UCP-1 activation. Indeed, it was demonstrated that UCP-1 activation improved glucose tolerance, which it was reported not only in adipose tissue but also in skeletal muscle despite of lipid accumulation (Han *et al.* 2004). Taken together, it is possible to speculate that after temperature reduction there exist an increased expression/activity of UCP-1 and then, fatty acid metabolism may be the main source for NADH and FADH₂ supply to mitochondrial oxidative respiratory chain. However, when norepinephrine is released, the metabolic source to maintain heat shifts towards glucose metabolism. Therefore, when norepinephrine is absent, free fatty acids support heat production by UCP-1 and then, aerobic glycolysis produces increased lactate dehydrogenase expression and activity. However, when norepinephrine is present during temperature reduction, the second step could be occurring shifting the source of heat production from free fatty acids towards glucose metabolisms. In this regard, probably to favour glucose metabolism throughout the tricarboxylic cycle, in the presence of norepinephrine, lactate dehydrogenase expression and activity were reduced in norepinephrine-incubated 32°C-exposed BAT as compared with those in 32°C-exposed BAT alone. However, specific experiments are needed and warranted to analyse this hypothesis.

Study considerations and limitations

Different *in vivo* studies, in denervated experimental animals, have suggested that catecholamines are responsible of UCP-1 up-expression and then of thermoregulation in BAT (Desautels *et al.* 1986, Scarpace and Matheny 1998, Denjean *et al.* 1999). However, there are contradicting results about whether the sympathetic system is the only system involved in thermoregulation or whether other non-dependent norepinephrine/ β -adrenergic receptor systems may be also associated with the thermoregulation processes (Festuccia 2010, Ye 2013). In this regard, it was also demonstrated increased UCP-1 expression in denervated animals was exposed to cold conditions (Festuccia 2010). Interestingly, a recent study described that independently of norepinephrine, cold-exposure was able to activate thermogenic genes in isolated white and beige adipocytes (Ye 2013). Although we are aware that the *in vitro* studies may not represent a strict physiological system, the *in vitro* studies in BAT, as we have shown here, may help to better analyse isolated molecular and biochemical mechanisms associated with thermoregulation.

Adipose tissue contains a heterogeneous array of cells including resident inflammatory macrophages, which depending on the physiological status and environmental conditions can lead to constitute up to 40% of the adipose cell population (Neels and Olefsky 2006). It has been recently described that in the adipose tissue macrophages have the ability to secrete catecholamines, promoting in BAT the up-expression of thermogenic-related gene. In this regard,

interleukin (IL)-4 stimulation in BAT promotes norepinephrine and tyrosine hydrolase expression in endogenous resident macrophages (Nguyen *et al.* 2011).

Our experimental design does not allow discerning of endogenous norepinephrine produced by the resident macrophages in BAT which may contribute to the observed changes in the energetic metabolism-related proteins. However, it is plausible that the amount of endogenously produced norepinephrine may not be enough to induce changes in the expression protein profile in BAT. In this regard, a recent study has suggested in response to IL-4 resident macrophages did not synthesise relevant amounts of catecholamines and hence, it did not had a direct role in adipocyte metabolism or adaptive thermogenesis (Fischer *et al.* 2017).

Another point to be commented is the measurement of LDH activity as determination of anaerobia metabolism. LDH release has been associated with cell damage and loss of cell viability. However, in the present study, LDH activity was performed in the tissue and not in the BAT supernatants. Moreover, LDH activity levels were reduced in conditions that initiate more stresses would exist, i.e. 32°C-exposed BAT in the presence of norepinephrine, as compared with 32°C-exposed BAT alone. Taken together these results may discard that LDH activity may reflex alteration in tissue viability.

Conclusions

In conclusion, this descriptive work shows for the first time that independently of norepinephrine, temperature reduction increases by itself the expression level of proteins associated with fatty acid transport into the mitochondria, lactate dehydrogenase, UCP-1 and decreased the mitochondrial F1 ATP synthase α -chain.

A better understanding of the energetic metabolic processes in BAT could be used to design specific therapeutic approaches for treating metabolic disorders, including obesity.

Acknowledgements

The authors thank Begoña Larrea for secretarial assistance.

Disclosure statement

The authors report no declaration of interest.

Funding

This work was supported by Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (RETICs) RD12/0042/0040 and RD12/0042/0033, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER).

References

- Bukowiecki, L.J., *et al.*, 1981. Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown. *Respiration*, 256, 12840–12848.

- Cannon, B., Houstek, J., and Nedergaard, J., 1998. Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Annals of the New York academy of sciences*, 856, 171–187.
- Chernogubova, E., Cannon, B., and Bengtsson, T., 2004. Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. *Endocrinology*, 145, 269–280.
- Chouchani, E.T., et al., 2016. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, 532, 112–116.
- Cypess, A.M., et al., 2012. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 109, 10001–10005.
- Denjean, F., et al., 1999. Differential regulation of uncoupling protein-1, -2 and -3 gene expression by sympathetic innervation in brown adipose tissue of thermoneutral or cold-exposed rats. *FEBS letters*, 444, 181–185.
- Desautels, M., Dulos, R.A., and Mozaffari, B., 1986. Selective loss of uncoupling protein from mitochondria of surgically denervated brown adipose tissue of cold-acclimated mice. *Biochemistry and cell biology = biochimie et biologie cellulaire*, 64, 1125–1134.
- Ellis, J.M., et al., 2010. Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell metabolism*, 12, 53–64.
- Festuccia, W.T., et al., 2010. Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR-gamma activation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 299, 159–167.
- Fischer, K., 2017. Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature medicine*, 23, 623–630.
- Han, D.H., et al., 2004. UCP-mediated energy depletion in skeletal muscle increases glucose transport despite lipid accumulation and mitochondrial dysfunction. *American journal of physiology*, 286, E347–E353.
- Hardman, M.J. and Hull, D., 1970. Fat metabolism in brown adipose tissue in vivo. *The journal of physiology*, 206, 263–273.
- Hittelman, K.J., Lindberg, O., and Cannon, B., 1969. Oxidative phosphorylation and compartmentation of fatty acid metabolism in brown fat mitochondria. *European journal of biochemistry*, 11, 183–192.
- Inokuma, K., et al., 2005. Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes*, 54, 1385–1391.
- Jieun, L., Ellis, J.M., and Wolfgang, M.J., 2015. Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress induced inflammation. *Cell reports*, 10, 266–279.
- Kadenbach, B., Ramzan, R., and Vogt, S., 2009. Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function. *Trends in molecular medicine*, 15, 139–147.
- Kozak, U.C. and Kozak, L.P., 1994. Norepinephrine-dependent selection of brown adipocyte cell lines. *Endocrinology*, 134, 906–913.
- López-Ibarra, Z., et al., 2015. Metabolic differences between white and brown fat from fasting rabbits at physiological temperature. *Journal of molecular endocrinology*, 54, 105–113.
- Ma, S., et al., 2012. Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *Journal of molecular cell biology*, 4, 88–96.
- Modrego, J., et al., 2012. Expression of cytoskeleton and energetic metabolism-related proteins at human abdominal aortic aneurysm sites. *Journal of vascular surgery*, 55, 1124–1133.
- Nakamura, K., et al., 2005. Sympathetic premotor neurons mediating thermoregulatory functions. *Neuroscience research*, 51, 1–8.
- Neels, J.G. and Olefsky, J.M., 2006. Inflamed fat: what starts the fire? *The journal of clinical investigation*, 116, 33–35.
- Nguyen, K.D., et al., 2011. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, 480, 104–108.
- Prusiner, S.B., et al., 1968. The regulation of oxidative metabolism of isolated brown fat cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 30, 508–515.
- Redman, L.M., et al., 2007. Lack of an effect of a novel beta3-adrenoceptor agonist, TAK-677, on energy metabolism in obese individuals: a double-blind, placebo-controlled randomized study. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92, 527–531.
- Rial, E. and González-Barroso, M.M., 2001. Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochimica et biophysica acta*, 1504, 70–81.
- Richard, D. and Picard, F., 2011. Brown fat biology and thermogenesis. *Frontiers in bioscience*, 16, 1233–1260.
- Rothwell, N.J. and Stock, M.J., 1979. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, 281, 31–35.
- Saito, M., et al., 2009. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, 58, 1526–1531.
- Scarpace, P.J. and Matheny, M., 1998. Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. *The American journal of physiology*, 275, E259–E264.
- Sell, H., Deshaies, Y., and Richard, D., 2004. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36, 2098–2104.
- Seydoux, J. and Girardier, L., 1977. Control of brown fat thermogenesis by the sympathetic nervous system. *Experientia*, 33, 1128–1130.
- Shaughnessy, S., et al., 2000. Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2^{-/-}) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte [correction of keratinocyte] fatty acid binding protein. *Diabetes*, 49, 904–911.
- Shimizu, Y., Nikami, H., and Saito, M., 1991. Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *Journal of biochemistry*, 110, 688–692.
- Townsend, K.L. and Tseng, Y.-H., 2014. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism*, 25, 168–177.
- Townsend, K.L., et al., 2013. Increased mitochondrial activity in BMP7-treated brown adipocytes, due to increased CPT1- and CD36-mediated fatty acid uptake. *Antioxidants & redox signaling*, 19, 243–257.
- Vallerand, A.L., Pesusse, F., and Bukowiecki, L.J., 1990. Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *American journal of physiology*, 259, 1043–1049.
- Vogt, S., et al., 2016. Revisiting Kadenbach: electron flux rate through cytochrome c-oxidase determines the ATP-inhibitory effect and subsequent production of ROS. *Bioessays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 38, 556–567.
- Watanabe, M., et al., 2008. Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31, 775–784.
- Wu, C., et al., 2014. Activating brown adipose tissue for weight loss and lowering of blood glucose levels: a microPET study using obese and diabetic model mice. *PLoS one*, 9, e113742.
- Ye, L., et al., 2013. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 110, 12480–12485.
- Zimmermann, R., et al., 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (New York, NY)*, 306, 1383–1386.